

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias

**DOTACION FLAVONOIDEA EN EL CITRUS  
LIMONUM VARIEDAD EUREKA**

Trabajo presentado para aspirar  
al Grado de Doctor en Ciencias,  
Sección de Químicas.

*Rafael Pastor Martínez*

**1975**

2/500

a725 p1

DOTACION FLAVONOIDEA

EN EL CITRUS LIMONUM

VARIEDAD EUREKA.

My T e  
8401





UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA AGRICOLA

PROF. O. CARPENA ARTES

OCTAVIO CARPENA ARTES, Catedrático numerario de Química Agrícola de la Universidad Autónoma de Madrid.

**CERTIFICO:**

Que la Memoria adjunta titulada "DOTACION FLAVONIDEA EN EL CITRUS LIMONUM VAR. EUREKA" presentada por el Licenciado D. Rafael Pastor Martínez para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas, ha sido realizada en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, bajo mi dirección y la del Dr. Francisco Tomás Lorente, Investigador Científico del C.S.I.C.

El presente ejemplar ha sido revisado por el profesor que certifica.

Madrid, 22 de Diciembre de 1975.

Trabajo presentado para aspirar al Grado de  
Doctor en Ciencias, Sección de Químicas.

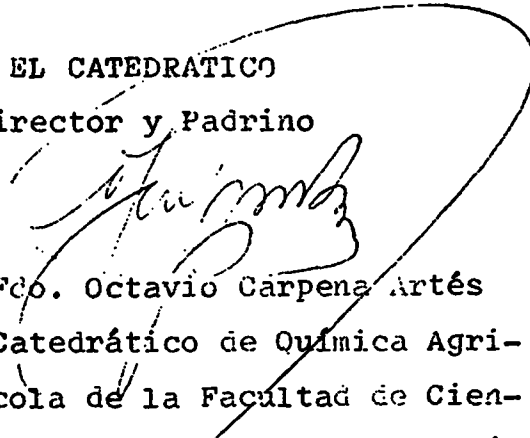
Madrid, 22 de Diciembre de 1975



Fdo. Rafael Pastor Martinez.  
Licenciado en Ciencias Químicas.


Visado en Madrid a 22 de Diciembre de 1975.

EL CATEDRÁTICO  
Director y Padrino



Fdo. Octavio Carpena Artés  
Catedrático de Química Agri-  
cola de la Facultad de Cien-  
cias de la Universidad Autó-  
noma de Madrid.

EL CODIRECTOR



Fdo. Francisco Tomás Lo-  
rente Investigador Cien-  
tífico del C.S.I.C.

Al Director Prof. O. Carpena Artés, mi gran reconocimiento y admiración por la forma magistral con que supo influenciarme, desde las aulas de la Universidad, con el germen de la investigación y el constante aliento que siempre me ha mostrado.

Al Codirector, Investigador Dr. F. Tomás Lorente, mi más sincero agradecimiento por su constante ayuda, consejos y orientación, en los caminos de la investigación, que han permitido la feliz terminación de esta tesis

## INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
1.1. Objeto	2
1.2. Justificación y fines	2
II. ANTECEDENTES	6
2.1. Generalidades	7
2.2. Extracción	9
2.3. Sistemas cromatográficos	11
2.3.1. Columna	11
2.3.2. Papel	13
2.3.3. Capa fina	18
2.4. Reacciones de color	21
2.5. Estudio estructural en U.V.	24
2.5.1. En medio neutro	24
2.5.2. Con reactivos alcalinos	34
2.5.3. Con reactivos metálicos.	41
2.6. Hidrólisis ácida.	44
2.7. C-glicósidos.	46
III. PARTE EXPERIMENTAL	51
3.1. Primera parte.	52
3.1.1. Estudio sobre columna de Sephadex	53

	pag.
3.1.2. Estudio espectrofotométrico en medio neutro, de flavonas.	59
3.1.3. Estudio en medio neutro de C-glicó- sidos.	77
3.2. Segunda parte. DOTACION FLAVONOIDEA	81
3.2.1. Sistemática seguida	82
3.2.2 HOJA	95
3.2.3 CORTEZA	167
3.2.4 FLOR	192
4. DISCUSION DE RESULTADOS	193
4.1. Parte I	193
4.2. Parte II	195
5. CONCLUSIONES	198
6. BIBLIOGRAFIA	201

# **I N T R O D U C C I O N**

=====



## 1.1 O B J E T O

Iniciamos este trabajo con la finalidad de estudiar la dotación de los flavonoides del C. Limonum var. Eureka. La realidad experimental nos ha mostrado lo ambicioso de nuestro propósito, ya que a pesar de los logros conseguidos al identificar diferentes flavonoides en la hoja, corteza y flor, hemos comprobado que existen otros en cantidades minoritarias, los que sólo hemos podido detectar como indicios. Pese a nuestro deseo de abordar el tema exhaustivamente, reconocemos que queda abierta la investigación sobre el mismo, para nosotros y para otros investigadores.

Como compensación a lo expuesto, hemos tenido la satisfacción de encontrar unas relaciones entre las respuestas espectrales de las flavonas y sus C-glicósidos en el ultravioleta, en medio neutro, y las estructuras de las mismas, lo que nos ha servido de una gran ayuda, y estimamos que constituye una de las más importantes aportaciones de esta tesis.

J U S T I F I C A C I O N

=====

Y F I N E S

=====

## 1.2 JUSTIFICACION Y FINES

La realización de ésta tesis está justificada por los siguientes conceptos:

- 1º.- Comercial e industrialmente el Citrus Limonum, variedad Eureka, es muy importante en Estados Unidos y en Italia, en donde estan la mayoría de los cultivos; en España, nos encontramos en un período de adaptación y aclimatación.
- 2º.- El conocimiento de la dotación flavonoidea de la variedad Eureka es interesante desde los siguientes puntos de vista:
  - a) Taxonómico. Puesto que permite establecer una clasificación botánica basada en el análisis cualitativo de los flavonoides.
  - b) Bioquímico. que permite conocer la dotación flavonoidea y su función específica en cada parte, ó órgano, de la planta; la evolución de la misma a lo largo de su vida; y las influencias ecológicas que pudieran afectarlas, así como la posible interrelación con determinados bio-

elementos, enzimas, y otras sustancias.

- c) Farmacológico. Por ser bien conocida su influencia sobre la permeabilidad capilar así como por poseer algunos de ellos propiedades diuréticas, cardiotónicas, antiurémicas, etc, y otras posibles propiedades nuevas.
- d) Fungistático. Algunos derivados muy metoxilados presentan ésta propiedad y ejercen una acción protectora sobre las distintas partes de la planta.
- e) Edulcorante. Determinadas chalconas de flavanonas tienen potentes propiedades edulcorantes.

3º.- Para efectuar el estudio de cada uno de los flavonoides de la variedad Eureka, nos apoyamos en las siguientes técnicas:

- a) Extracción, empleando disolventes de distinta polaridad.
- b) Aislamiento, separación y purificación de cada uno de los compuestos por cromatografía en columna y papel.
- c) Identificación. Para lo que hemos utilizado los siguientes métodos:
  - 1) Reacciones de color.
  - 2) Estudio espectral en U.V. en medio neutro.
  - 3) Estudio espectral en U.V. con reactivos alcalinos.

- 4) Estudio espectral en U.V. con reactivos metálicos.
- 5) Cromatografía en papel.
- 6) Cromatografía en capa fina.
- 7) Estudio de las agliconas y azúcares, en los respectivos hidrolizados, por cromatografía en papel y capa fina.
- 8) Hidrólisis alcalina para el estudio del anillo B.

2.    A N T E C E D E N T E S  
=====

## 2.1. GENERALIDADES SOBRE EL CITRUS LIMONUM

### VARIEDAD EUREKA

El limonero Eureka es un árbol de tamaño pequeño. Tiene hojas grandes de color verde oscuro con ápice redondeado. El fruto es de mediano tamaño, de forma elíptica y pezón pequeño. Su corteza es ligeramente rugosa y de mediano espesor. La pulpa es de grano fino, color amarillo verdoso y muy jugosa. El zumo es claro, ácido y aromático. Generalmente con pocas ó ninguna semilla.

Las flores, comúnmente conocidas con el nombre de azahar (del árabe azhar = flor), son generalmente hermafroditas, de tamaño mediano, de aspecto céreo y color generalmente blanco, teñidas de rojo púrpura en el dorso de los pétalos, cuya cara ventral es blanca, marcando tonos rojizos cuando estan en capullo. Son fragantes de aroma "sui generis" muy delicado. Nacen en las axilas de las hojas.

El limonero puede florecer en cualquier época dentro del periodo vegetativo de la planta, si bien durante la primavera es cuando lo hace con mayor intensidad.

El Eureka es la variedad más cultivada en

California por su gran rendimiento. La cosecha más importante tiene lugar de octubre a diciembre, y de marzo a mayo presenta otra de menor importancia.

Existen grandes discrepancias entre los botánicos acerca de la clasificación de los agrios, puesto que unos los incluyen entre las auranciáceas y otros entre las rutáceas.

Swingle, 1948, clasifica según el siguiente orden:

Familia .....	Rutáceas
Subfamilia .....	Aurancioideas
Tribu .....	Citreas
Subtribu .....	Citrinas
Género .....	Citrus
Subgenero .....	Eucitrus
Especie .....	C. Limonum.



## 2.2 EXTRACCION

La extracción de los flavonoides a partir de productos vegetales no presenta grandes inconvenientes, aunque en ciertos casos puede ser necesaria una purificación inicial del extracto.

Antes de iniciar la extracción deben inhibirse previamente, en la materia vegetal, las acciones enzimáticas y bacterianas, lo que se logra por tindalización ó por congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-30^{\circ}\text{C}$ , con objeto de evitar alteraciones de los componentes termosensibles. Dentro de la célula vegetal existen diferentes tipos de enzimas que pueden alterar los componentes fenólicos, tal es la acción de las polifenoloxidasas y glicooxidasas.

Los polifenoles en general y entre ellos los flavonoides en particular, en los productos vegetales van acompañados de sustancias no fenólicas que interfieren en el proceso de extracción. Por ello, es conveniente efectuar una extracción previa de estas sustancias no fenólicas mediante un tratamiento previo con disolventes no polares (éter de petróleo, benceno, cloroformo, hexano, etc.), seguido de una extracción con disolventes polares (alcoholes, agua, etc.).

Con los disolventes no polares se eliminan principalmente grasas, ceras, clorofilas, clorofilinas y carotenoides; así como también ciertos flavonoides muy metoxilados en forma de agliconas.

El metanol y etanol suelen ser los disolventes elegidos por presentar ventajas, tales como su fácil eliminación, su carencia de respuesta espectral en la zona del ultravioleta, inhibir las acciones hidrolíticas que pueden tener lugar en este proceso, y su relativo bajo precio.

La extracción se puede realizar en frío (percolación), ó en caliente (Soxhlet); debiéndose proceder a la eliminación de las pectinas arrastradas en el extracto por filtración en frío; efectuándose seguidamente la concentración de dicho extracto al vacío y a baja temperatura ( Rotovapor ).

La purificación de los extractos es un paso aconsejable en determinados casos. Para este objeto pueden emplearse diferentes procedimientos, tales como el empleo de Amberlitas específicas, carbón animal, sales de plomo, sistemas cromatográficos y disolventes selectivos.

## 2.3. SISTEMAS CROMATOGRAFICOS.

### 2.3.1. CROMATOGRAPHIA EN COLUMNA.

Michael Tsweet, 1903, descubrió la cromatografía de adsorción. Halló que los pigmentos vegetales, tales como la clorofila pueden separarse filtrando su disolución, en éter de petróleo, a través de una columna de carbonato cálcico.

La cromatografía quedó prácticamente olvidada hasta 1931, fecha en que Khun y Lederer la desarrollaron ampliamente.

Martin y Synge, 1941, utilizaron la cromatografía de reparto, empleando gel de sílice y agua; Strain, 1942, fué el primero que aplicó la cromatografía a la separación de los compuestos flavonoides.

En los últimos años se han perfeccionado y desarrollado técnicas de análisis cromatográfico y estudiándose ampliamente la influencia de los adsorbentes y su preparación, las de los disolventes, la velocidad de desarrollo, y los métodos de elución.

Se han publicado un elevado número de trabajos sobre la separación de flavonoides por cromatografía.

tografía en columna, tanto a partir de extractos vegetales como de hidrolizados.

Dentro del gran número de adsorbentes que se utilizan en cromatografía, nos hemos basado en el Sephadex para el desarrollo de nuestra parte experimental.

El Sephadex es un dextrano modificado en el que sus macromoléculas se unen para formar una red tridimensional de cadenas de polisacáridos.

Gelotte, 1960, ha demostrado que el Sephadex, tiene tendencia a la adsorción de compuestos aromáticos, especialmente fenoles.

Sjovall y Vihko, 1966, han empleado con éxito el tipo LH-20 para separaciones analíticas de compuestos heterocíclicos aromáticos; Nilson, 1962, separó una mezcla de isoflavonas y pudo establecer una cierta relación entre el volumen de elución y la estructura.

Wilk, 1966, Janson, 1967 y Jhonston, 1968, emplearon con éxito columnas de Sephadex para la separación de flavonoides de diferentes extractos vegetales.

Coffin, 1971 y Tomás, 1972 y 1973, han utilizado la cromatografía en columna de Sephadex, de diferentes tipos, para productos cítricos y flavonoides puros

### 2.3.2. CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

La cromatografía sobre papel es una de las técnicas más simples y antiguas dentro de la cromatografía. La separación de los productos se efectúa sobre papel, en tiras ó en hojas, según las necesidades, se puede trabajar con diferentes tipos de papel en los que varía el espesor y el desarrollo. Para cromatografía preparativa se puede usar el Whatman nº3, ó el Whatman 3MM, y para separaciones el Whatman nº3 y nº 1.

Consden, Gordon y Martin, 1944, fueron los primeros en utilizar el papel para cromatografía sustituyendo la sustancia soporte, gel de sílice, por tiras de papel.

Los disolventes más empleados, ó más generalizados, son el butanol- ac. acético - agua, en diversas proporciones; el Forestal ; el ácido acético a concentraciones superiores al 30 % para agliconas, y por debajo del 30 % para los glicósidos; el butanol-ac. acético- agua, para glicósidos ó agliconas.

El butanol-ac. acético-agua es el más importante en el estudio y separación de flavonoides. Este disolvente fué inicialmente propuesto por Partridge, 1947, para la separación de azúcares, y utilizado por Räte-Smith, 1948, para la separación de flavonoides.

Con el tiempo, en los eluyentes se producen esterificaciones, por lo que los valores de  $R_f$  no son reproducibles en estos casos; de aquí la conveniencia de preparar el disolvente cuando se vaya a utilizar.

El disolvente Forestal: ac. acético-agua-ac. clorhídrico, (30.10.3),(v.v.v), fué propuesto por Bate-Smith, 1945, para la separación de antocianidinas, y posteriormente se ha comprobado su utilización para las agliconas de flavonoides; a pesar de tener el inconveniente de no poderse emplear en cromatografía preparativa, puesto que el ácido clorhídrico que lleva en su composición hidrolizaría los glicósidos; este disolvente tiene la ventaja de separar los glicósidos e impurezas que contenga la muestra de los glicósidos flavonoideos, dado que mientras el valor del  $R_f$  de los primeros es muy elevado, (superior a 0,75), el de sus agliconas es más bajo.

El ácido acético diluido, como disolvente sólo se utiliza para la separación de los glicósidos de las agliconas, ya que estas no se desplazan prácticamente.

Los disolventes acuosos, incluso el agua destilada, permiten una buena separación de los compuestos flavónicos, Roberts, 1956.

Mabry, Markham y Thomas, 1970, han utilizado el ácido acético al 15 % para la cromatografía mono y bidimensional; complementándolo con el empleo del T B A ( butanol terciario- ac.acético-agua), (3.1.1), (v.v.v).

Bate-Smith, 1949, propuso el empleo de una mezcla de m-cresol, ac.acético y agua, en la proporción volumétrica (50.2.48). Este disolvente tiene el interés de que para los glicósidos presenta un orden de valores de Rf diferente a los que se obtienen con el butanol-ácido acético-agua, (4.1.5).

Lebreton, 1967, ha utilizado el ácido acético al 60 % para la separación de los flavonoes, las flavonas y los dihidroflavonoles. Horowitz, 1960, emplea ac.acético al 50 % para la separación de agliconas de flavonas y flavonoles por cromatografía sobre papel. Gentili y Horowitz, 1968, han trabajado con ácido acético al 10 y al 30 %, para la identificación en Citrus de los C-glicósidos de la apigenina y della diosmetina.

#### Observación de cromatogramas

Muchos de compuestos flavonoideos son incoloros a la luz visible, pero adquieren color amarillo cuando se pulverizan con una disolución alcalina, o por la exposición de los cromatogramas a los vapores

de una disolución concentrada de amoníaco. Geissman, 1962. El examen a la luz ultravioleta es el método más generalizado.

Se acostumbra a revelar los cromatogramas mediante un procedimiento mixto, que consiste en la exposición a los vapores de amoníaco, observando el cromatograma a la luz visible y en el ultravioleta.

Harborne, 1967, resume los resultados de la observación de los flavonoides, a la luz ultravioleta, de la siguiente forma:

A.- Los flavonoles y sus heterósidos, en los que el grupo -OH en posición 3 está libre, muestran manchas amarillas, cuyas diferencias de tono son lo suficientemente nítidas para utilizarlas en la identificación de estos compuestos: el kaempferol, amarillo-verdoso; la isorhamnetina y la quercetina, amarillo; y la miricetina, amarillo dorado.

B.- Las flavonas y los derivados de los flavonoles en los que el -OH en 3 esté ligado a una combinación glicosídica, en la observación directa a la luz ultravioleta aparecen manchas marrón oscuro, las que cambian de color a amarillo brillante cuando se exponen a la acción directa de los vapores del amoníaco.



C.- Los flavonoles que no posean -OH en la posición 5, caso de la fisetina y la robinetina, presentan a la luz ultravioleta fluorescencia amarilla, ó amarillo-verdosa.

D.- Tanto las flavanonas como las isoflavonas son difícilmente detectables por observación directa a la luz ultravioleta; pero cuando esta observación se efectúa en presencia de vapores de amoníaco la coloración es amarillo-pálida ( naringenina, hesperetina y eriodictiol).

E.- Las chalconas presentan color amarillo cuando se observan a la luz visible, y marrón en la luz U.V., color que vira a rojo en presencia de vapores amoniacales.

Los reveladores más utilizados son :  
el  $\text{Cl}_3\text{Al}$  anhidro al 1 % en etanol; el reactivo de Davideck (Davideck, 1961); bencidina diazotada, Koch , 1938, y el reactivo de Neu, 1957.

### 2.3.3 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Izmailov y Schreiber, 1938, ensayaron por primera vez la cromatografía en capa fina extendiendo óxido de aluminio sobre placas de vidrio. Posteriormente Meinhard y Hall, 1949, emplearon el almidón, como aglutinante, para lograr una mayor estabilidad de las placas preparadas

Reitsema, 1954, elaboró cromatoplasmas para utilizarlas en cromatografía bidimensional.

Sthal, 1956, logró datos reproducibles y concretos con estas técnicas.

Las ventajas principales de la cromatografía sobre placa, respecto a las de papel, son: mayor nitidez, sensibilidad, rapidez en el desarrollo de las cromatoplasmas y mayor duración de las placas reveladas.

Con un buen disolvente, un lecho adecuado y un grado de saturación satisfactorio, el desarrollo de una cromatoplasma se puede lograr entre media y una hora, mientras que una cromatografía en papel necesita siempre más de dos horas. Las dimensiones más corrientes de las placas son de 5x20, 10x20, 20x20, y 40x20 cm. El espesor de una placa para cromatografía preparativa es de 2,5 mm, y el de una para fines identificativos de 0,25 mm.

Los adsorbentes más empleados en este tipo de cromatografía son el gel de sílice, el óxido de aluminio, la celulosa, la poliamida y el Sephadex.

A pesar de haberse utilizado muchos tipos de gel de sílice, los más empleados son los tipos G y H fabricados por la casa Merck. El tipo G contiene un 13 % de yeso y el tamaño de sus granos es de 5 a 25 micras. El tipo H presenta análogas características morfológicas y de tamaño que el anterior, pero no contiene aglutinantes orgánicos ni yeso.

El óxido de aluminio es apropiado para la separación de terpenos, alcaloides, esteroides, combinaciones aromáticas y alifáticas. Aunque existen varios tipos de óxidos de aluminio, el más empleado es el tipo G, Merck, que tiene reacción alcalina y al que conviene calentar durante media hora a 120°C antes de su utilización; su actividad es menor que la del gel de sílice, Merck, del tipo G. El óxido de aluminio, TLC, Serva, no contiene aglutinante y presenta reacción débilmente alcalina.

El kieselgur más empleado es el tipo G Merck; este producto tiene una mayor rapidez de adsorción que el gel de sílice G, y que el óxido de aluminio G.

Existen varias clases de polvo de celulosa sin modificar que se emplean en cromatografía en capa fina. La casa Macherey y Nagel fabrica celulosa en polvo, MN 300, exenta de yeso, con y sin indicador de fluorescencia.

Un buen adsorbente en cromatografía de capa fina es la poliamida con la que puede separarse los glicósidos y agliconas de flavanonas. Estas placas tienen el inconveniente de ser muy frágiles. Albach y Redman, 1969, la emplean para la separación de los citroflavonoides, y Coffin, 1971 separa las flavanonas de algunos cítricos.

Eluyentes: El tipo de eluyente a emplear depende del adsorbente que se utilice y de los productos que se trate de separar.

## 2.4. REACCIONES DE COLOR

En los flavonoides aislados y purificados puede estudiarse la identificación de su grupo por diferentes reacciones de color, tanto en la luz visible como en la ultravioleta.

Las respuestas coloreadas responden tanto a la estructura básica, como a la presencia de determinados sustituyentes.

Por no haberse encontrado reacciones específicas se recurre a varias de ellas para reconocer la identidad, a priori, de las flavonas, flavonoles, glicósidos en 3 de flavonoles, flavanonas y chalconas.

Para mayor garantía de los resultados se deben analizar los espectros en el ultravioleta de los flavonoides disueltos en medio neutro (metanol o etanol), que es el medio más aconsejable para practicar las reacciones coloreadas.

Conjunto de reacciones de color para el reconocimiento de grupos flavonoideos.

ClH + Mg

Flavonas	- Amarillo, rojo.
Flavonoles	- Rojo, magenta.
Flavanonas	- Rojo, magenta, violeta, ó azul.
Chalconas	- Amarillo, naranja, rojo
Dihidrochalc.	- De incoloro a amar. débil.

NaOH

Flavonas	- Amarillo
Flavonoles	- Amarillo, naranja ó marrón
Flavanonas	- Amarillo naranja en frío y rojo en caliente.
Chalconas	- Amarillo, naranja ó rojo.
Dihidrochalc.	- Incoloro, amarillo-débil

ClH + Zn

Flavonas	- Rojo
Flavonoles agliconas	- rosa oscuro
Flavonoles glicósidos	- rosa claro
Flavanonas	- Rosa.

Cl<sub>3</sub>Al

Flavonas	- Amarillo
Flavonoles	- Amarillo verdoso
Flavanonas	- Azul verde fluorescente
Chalconas	- Amarillento.

SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> conc.

Flavonas	- Amar.intenso ó amar. rojizo
Flavonoles	- Amar. naranja fluorescente
Flavanonas	- Naranja carmín
Chalconas	- Naranja rojo
Dihidrochalconas	- incol. ó amar. débil.

Las agrupaciones elegidas son las existentes en los Citrus.

## 2.51. ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO EN U.V. DE FLAVONOIDES EN

### MEDIO NEUTRO

Se han publicado numerosos trabajos sobre espectrofotometría de flavonoides en U.V. con objeto de relacionar las estructuras con las respuestas espectrales. A este respecto son fundamentales los trabajos de Geissman, 1962, Jure, 1962, Harborne, 1964, y Mabry, 1970.

No existen unas leyes fijas que establezcan la relación entre las respuestas en ultravioleta de los flavonoides y sus estructuras, ya que la interpretación de las medidas se realiza sobre una base empírica, en la mayoría de los casos.

Todas las sustancias fenólicas presentan una fuerte absorción en la región del ultravioleta. En la tabla I se exponen las respuestas espectrales en U.V. de algunas de las familias fenólicas, según Geissman, 1962.



TABLA - I                      ESPECTROS DE ALGUNAS FAMILIAS  
DE POLIFENOLES.

<u>Familia</u>	<u>Máximo principal(nm)</u>	<u>Máximo secundario</u>
Flavonas	250-270 330-350	--- ---
Flavonoles	250-270 350-390	300 ---
Flavanonas	275-290 290-330	--- ---
Isoflavonas	255-265	310-330
Chalconas	365-390	240-260

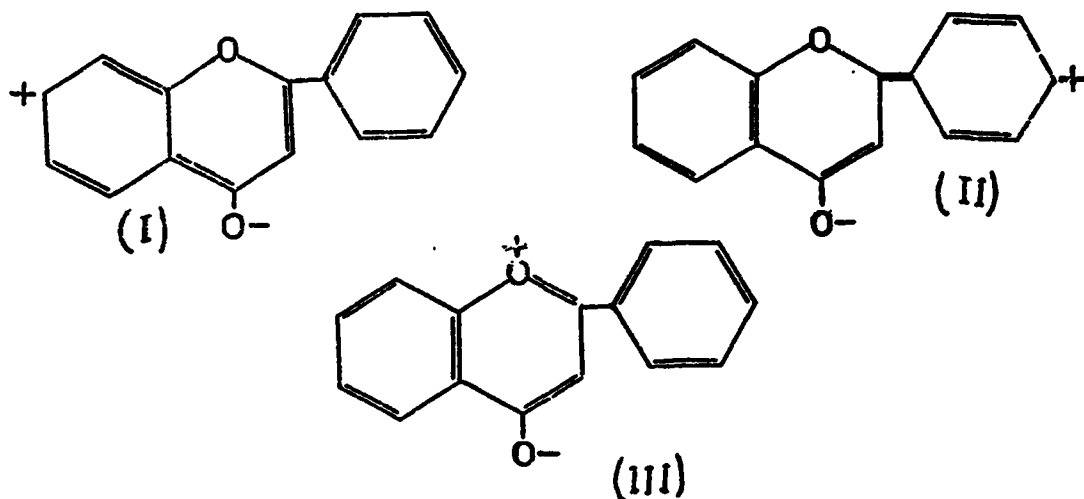
Geissman, 1962, tratando de sistematizar los máximos observados, considera dos bandas cromáticas: la banda I, comprende el intervalo de 320-380 nm, y la banda II, entre 240-270 nm, para flavonas y flavonoles.

Tomás, 1972, propone unas bandas más amplias, designando como banda A a la zona comprendida entre 300-450 nm, como banda B entre 240-300 nm y como banda C entre 200-240 nm.

La variación de la posición e intensidad de la longitud de onda del máximo, ó inflexión, en cada banda depende del tipo de resonancia. En los derivados con dobles enlaces en posición 2-3 se produce un efecto de conjugación entre los anillos A y B, lo que explica la interrelación de la resonancia relativa entre dichos anillos; por lo que, las respuestas de éstos derivados pueden considerarse interdependientes. Debemos tener en cuenta, que el anillo A dá su respuesta en la Banda II, y el anillo B la expresa en la Banda I, aunque existen respuestas comunes debidas a la resonancia conjunta entre los anillos A y B por efecto de conjugación.

Para explicar el comportamiento de determinadas respuestas espectrales condicionadas por la presencia de ciertos sustituyentes que producen resonancias específicas, Jurd, 1962, considera la coexistencia de tres estructuras fundamentales:

Benzoilo (I), Cinamoilo (II) y Gamma-pirona (III)

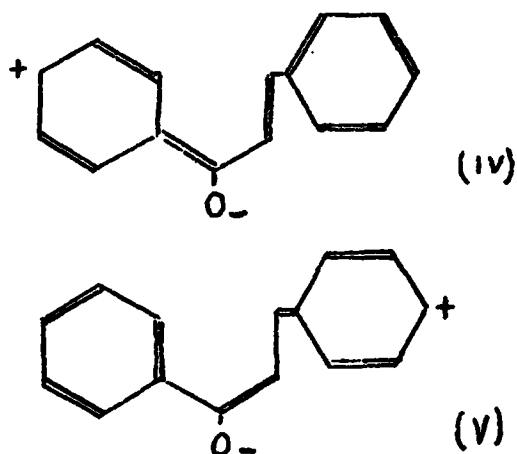


El grupo cinamoilo explica el comportamiento de los sustituyentes que existen en el anillo B, y que se manifiestan, principalmente, en la Banda I. El benzoilo explica el comportamiento de los flavonoides con sustituyentes en el nucleo A, especialmente en la posición 7, con respuesta espectral en la Banda II.

La gamma-pirona explica el comportamiento del sustituyente en posición 5 y el sistema de relación resonante con el grupo carbonilo, cuya respuesta se muestra en la banda B.

Las flavanonas y los flavanonoles por carecer de doble enlace entre las posiciones 2 y 3 no pueden adoptar dichas configuraciones.

Las chalconas podrían presentar las formas benzoilo y cinamoilo. (IV y V) respectivamente.



En general, la introducción de grupos -OH, ó metoxilos, en el anillo A incrementa la resonancia del mismo y tiende a aumentar la intensidad y longitud de onda en la Banda II. Por ejemplo, la conversión de flavona en crisina (5-7 di-OH flavona) produce un desplazamiento en intensidad y un efecto batocrómico de 20 nm, transformándose el máximo de la Banda I en una inflexión a unos 310 nm.

En las flavonas y flavonoles que contienen sólo un sustituyente en posición 4' (apigenina y kaempferol), la respuesta en la banda II consta de un sólo máximo. Para las flavonas y flavonoles que tienen sustituyentes hidroxilados, ó metoxilados, en las posiciones 3' y 4' (luteolina, diosmetina, crisoeriol, quercetina, etc.), en la Banda II se aprecian dos máximos bien definidos, ó un máximo y una inflexión clara.

Veamos las respuestas espectrofotométricas de algunos derivados:

Apigenina	336, 296 <sup>a</sup> , 267
Luteolina	349, 267 , 252, 242 <sup>a</sup>
Crisoeriol	347, 269 , 249 <sup>a</sup> , 241
Kaempferol	367, 322 <sup>a</sup> , 294 <sup>a</sup> , 266 , 253 <sup>a</sup>
Quercetina	370, 301 <sup>a</sup> , 269 <sup>a</sup> , 255

(a). Inflexión.

Efectos de la metilación, ó glicosidación, sobre los espectros de flavonas y flavonoles.

Metilación del -OH en 5

El -OH en posición 5 está relacionado con la estructura pirónica. La metilación en ésta posición produce un considerable efecto hipsocrómico, de 5 a 15 nm, en las Bandas I y II, como indican los siguientes ejemplos:

TABLA II				
Compuesto	nm.	Compuesto	nm.	Dif.
5,4'-OH,7-OCH <sub>3</sub> flav.	335	4'-OH,5,7-OCH <sub>3</sub> flav.	327	-8
	269		259	-10
4'7 dietil vitex.	326	5,7,4'trietil vitex.	312	-14
	270		265	- 5
Diosmina	345	3'-OH 5,7,4'-OCH <sub>3</sub> flav.	333	-11
	255		245	-10
Kaempferid	367	5,4'-OCH <sub>3</sub> Kaempferol	357	-10
	265		259	-7

### Copulación del -OH en posición 3.

Esta metilación, o glicosidación, produce un desplazamiento hipsocrómico en la Banda I, que no afecta a otras respuestas en la Banda II; por ejemplo la quercetina con dos máximos a 371 y 257 nm, y la rutina, que además contiene ramnosa-glucosa en posición 3, tiene sus máximos a 361 y 258 nm, con unas diferencias de -10 y + 1 nm, respectivamente. La quercitrina contiene ramnosa en posición 3, y sus máximos se observan en la Banda I y II a 350 y 255 nm, respectivamente, en ellos puede apreciarse lo anteriormente comentado.

### Copulación del -OH en posición 7.

Al introducir un grupo -CH<sub>3</sub>, ó un glicósido en esta posición, no se observa efecto alguno, tanto en la Banda I como en la II; como puede comprobarse al comparar los máximos de la apigenina (336 y 269 nm), con los de la genkwanina (7-metil), 335 y 269 nm, en donde puede apreciarse que los desplazamientos son prácticamente nulos, así como también en la quercetina (máximos a 371 y 257 nm) y la quercimeritrina con máximos a 372 y 257 nm.

La metilación de un -OH en posición 4' produce un efecto hipsocrómico de 1 a 2 nm en la Banda I, en las flavonas y flavonoles. Para las flavonas el desplazamiento en la Banda II es batocrómico, de 2 a 6 nm, y para los flavonoles es hipsocrómico, de 1 a 2 nm. En la tabla II se exponen unos ejemplos:

TABLA III

<u>Compuesto</u>	<u>max</u>	<u>Compuesto</u>	<u>max</u>	<u>Dif.</u>
4'-OH flavona	327	4'-OCH <sub>3</sub> flavona	317	- 10
	251		253	+ 2
Apigenina	336	Acacetina	328	- 8
	269		273	+ 4

#### Espectros de flavonas y flavonoles fuertemente alquilados

En compuestos de este tipo, tales como la tangeretina (pentametoxy-flavona), la nobiletina (hexametoxy-flavona), y otros que, ó no presentan grupos ionizables, o los tienen muy escasos, y por lo tanto no son susceptibles de originar quelatos, solo pueden utilizarse los datos en medio neutro.

### Efecto de la acetilación en flavonas y flavonoles.

Cuando un flavonol se acetila, como la quercetina, el resultado de su respuesta espectrofotométrica es similar a la de la flavona sin ningún sustituyente.

Quercetina, máximos a 371 y 257 nm.

Quercetina metilada, máximos a 300 y 252 nm.

Flavona, máximos a 297 y 250 nm.

### Flavanonas

En las flavanonas, al igual que en las isoflavonas y los dihidroflavonoles, el anillo B no está conjugado con el grupo carbonilo, por lo que estos compuestos presentan una mayor absorbancia en la banda II con un máximo característico, Geissman, 1962.

Las flavanonas y los dihidroflavonoles manifiestan un máximo entre 270 y 295 nm, y las isoflavonas un máximo bien definido entre 245 y 270 nm, Mabry, 1970.

Los espectros de las flavanonas y los dihidroflavonoles son muy similares:

7,4'-OH	flavanona	276, 312 nm.
3,7,4'-OH	"	276, 312 nm.
5,7,3'4'-OH		289, 324 nm.
3,5,7,3'4'-OH		290, 327 <sup>a</sup> nm.

(a) Inflexión.



La carencia de -OH en 5, en flavanonas y dihidroflavonoles, se manifiesta por un desplazamiento hipsocrómico característico en la Banda II.

## 2.5.2 ANALISIS ESTRUCTURAL EN U.V. POR MEDIO DE REACTIVOS

### ALCALINOS

El estudio de la situación de grupos hidroxílicos libres contenidos en la molécula del flavonoide es posible con el empleo de ciertos reactivos de carácter básico observando las diferencias de las absorciones en el ultravioleta, con respecto a las obtenidas con el mismo flavonocide en medio alcohólico.

Mansfield y Nordström, 1953, emplearon el etilato sódico para el estudio de flavonas y flavonoles; Jurd, Geissman y Horowitz, 1957, efectúan un estudio similar con acetato sódico; Tomás, 1972, ha utilizado amoníaco, acetato sódico, etilato sódico y metilato sódico.

Estos reactivos producen una ionización de los hidroxilos contenidos en la molécula, de forma tal, que según afecten al anillo A, ó al anillo B, formas benzoilo y cinamoilo, darán lugar a distintas resonancias que provocan diferentes respuestas en las Bandas B y A, con efecto batocrómicos en la mayoría de los casos.

Tomás, 1972, ha obtenido los siguientes resultados:

Con amoníaco 0,01 M.

En las flavonas y flavonoles

No se afecta el hidroxilo en posición 5, siempre que existan otros hidroxilos libres.

La ionización del grupo hidroxilo en posición 7, se traduce en un desplazamiento batocrómico en la banda B de 7 a 22 nm. Si dicho hidroxilo está bloqueado, no hay desplazamiento de la respuesta en dicha banda, tal es el caso de la tectocrisina y apiina.

La ionización de los hidroxilos en posición 3 y 4', se traduce en una respuesta en la banda A, con batocromía superior a 15 nm.

Los glicósidos de flavonoles conjugados en posición 3 incrementan el efecto batocrómico en la banda A.

En las flavanonas, flavanonoles y chalconas

El hidroxilo en posición 7 es el que origina la fuerte batocromía, en el máximo de la banda B, que se desplaza a la banda A. Si dicho hidroxilo está bloqueado no hay desplazamiento cromático, este es el caso de la hesperidina y de la metilchalcona de

la hesperidina. En general, la característica común a estos compuestos con hidroxilo libre en posición 7, es la desaparición de respuestas en la banda B, lo que puede servir para su caracterización.

Con acetato sódico 0,002 M.

En las flavonas y flavonoles

La ionización del hidroxilo en posición 5 es muy débil, ya que los desplazamientos en la banda B no ofrecen absorciones apreciables.

En los flavonoles, el efecto ionizante producido en los hidroxilos en posiciones 3, 4' y 7 originan hipsocromía en la banda A (-23 nm), lo que puede utilizarse para su caracterización.

Los glicósidos de los Flavonoles, al tener bloqueado el hidroxilo en posición 3, no acusan desplazamientos en su respuesta en la banda A, hecho que no ha sido observado con ningún otro reactivo alcalino y que permite la caracterización de tales compuestos.

En las flavanonas, flavanonoles y chalconas

Cuando el -OH en posición 7 está libre,

hay un desplazamiento batócronico de 34 o 37 nm en el máximo de la banda B.

#### Con etilato sódico 0,002 M

#### En flavonas y flavonoles

Los desplazamientos de los espectros en ambas bandas suelen ser heterogéneos, presentándose anomalías para determinados flavonoides, que pueden servir para su caracterización; tal es el caso del kaempferol y de la fisetina, en donde se aprecia fuerte hipsocromía en la banda A.

#### En flavanonas, flavanonoles y chalconas

Los flavanonoles se caracterizan por su fuerte desplazamiento batocrómico, tanto en la banda A ( $D_A$  superior a 75 nm), como en la banda B ( $D_B$  superior a 36 nm).

La metil chalcona de la hesperidina presenta una batocromía en la banda A igual a 10, valor que se puede utilizar para su identificación.

Las flavanonas se diferencian de los flavanonoles por su respuesta batocrómica en la banda B que es siempre inferior a 15 nm

### Metilato sódico

Segun Mabry, 1970, la adición de NaOMe a flavonas disueltas en metanol produce desplazamientos batocrómicos en todas las bandas de absorción. Un desplazamiento en la banda I de 40 a 65 nm, sin disminuir su intensidad, indica la presencia de un hidroxilo libre en 4'. Los flavonoles que carecen de hidroxilo en 4' muestran un desplazamiento de 50 a 60 nm en la banda I, con decrecimiento en intensidad.

Según Dechene, 1951, y Jurd y Horowitz, 1957, los flavonoles que tienen en su molécula hidroxilos libres en las posiciones 3 y 4' son inestables en presencia de NaOMe, alterando en pocos minutos las respuestas obtenidas.

### Detección de grupos -OH en flavonas y flavonoles por efecto de la adición de NaOAc/BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>.

En presencia de NaOAc, el ácido bórico forma un quelato con los grupos O-diOH del núcleo del

flavonoide. Las flavonas y flavonoles con agrupación O-diOH en el anillo B muestran un desplazamiento batocrómico en la banda I de 12 a 30 nm, con respecto al espectro en metanol. Las agrupaciones O-diOH 6,7 y 7,8 producen desplazamientos de 5 a 10 nm con respecto al espectro en metanol, Mabry, 1970

#### Espectros en U.V. de flavanonas en presencia de NaOMe.

Los espectros de flavanonas con hidroxilos en el anillo A expresan batocromía en la banda II en presencia de NaOMe. Las 5-7 di-OH flavanonas presentan un desplazamiento de unos 35 nm y para las 7-OH flavanonas de unos 60 nm. El desplazamiento vá acompañado de aumento de intensidad en la banda II.

Algunas flavanonas, especialmente aquellas que carecen de hidroxilo en 5, se isomerizan a chalconas, presentando un espectro totalmente diferente. Narasinhachari 1948, 1950, 1959, y Jurd 1961.

Las flavanonas con -OH en las posiciones 5,6,7 ó 6,7,8 se descomponen en presencia de metilato sódico. Horowitz y Jurd, 1961, aprecian que las que contienen una agrupación O-dihidroxílica se descomponen rápidamente con adición de NaOH, pero no en presencia de NaOMe.

Determinación del grupo O-dihidroxílico en el anillo  
A por adición de NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

En las flavanonas, isoflavonas y flavanones se produce un desplazamiento batocrómico al adicionar estos reactivos de 10 a 15 nm en la banda I, cuando los compuestos tienen agrupación O-diOH en posiciones 6-7. Con estos reactivos no se puede analizar la agrupación O-dihidroxílica en posiciones 3' y 4' por falta de conjugación con el cromóforo mayor.



### 2.5.3 ANALISIS ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES EN U.V. POR MEDIO DE REACTIVOS METALICOS FORMADORES DE COM- PLEJOS.

Los flavonoides son capaces de formar complejos metálicos, de tipo quelato, con determinados reactivos. Las condiciones estructurales necesarias para que tenga lugar la formación de estos quelatos, exige la existencia de una disposición resonante que está determinada por la presencia de grupos hidroxilo libres en las posiciones 5, y 3 cuando existe doble enlace entre las posiciones 2 y 3.

También es posible la formación de complejos queláticos en posiciones orto-hidroxílicas, aunque este tipo de complejos es menos estable. La agrupación más generalizada, en los flavonoides con doble enlace en posición 2-3, con posibilidad de

formar complejos es la orto-hidroxílica en 3'y 4'.

El cloruro de aluminio es el reactivo metálico utilizado por la mayoría de los investigadores entre los que se encuentran: Geissman, 1953; Swain, 1954; Harborne, 1954 , y Mabry, 1970. Este último incorpora la variante de adicionar a la disolución neutra ( etanol, ó metanol al 90 %), ácido clorhídrico con objeto de estudiar los espectros de las flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas y auronas.

Tomás, 1972, ha obtenido interesantes conclusiones utilizando, además del cloruro de aluminio, otros cationes metálicos tales como  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Sb}^{+3}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$ , y  $\text{Zn}^{+2}$ ; reactivos que presentan la ventaja de aclarar determinados aspectos estructurales de los flavonoides.

Jurd, 1962, demostró que es posible la investigación de los grupos  $-\text{OH}$  en posición 3 y 5 en flavonas y flavonoles, empleando cloruro de aluminio y estudiando los desplazamientos batocrómicos en las bandas I y II.

Mabry, 1970, adicionando ácido clorhídrico a la disolución de cloruro de aluminio con el flavonoide, pudo determinar no sólo la presencia de hidroxilos en las posiciones 3 y 5, sino también la agrupación orto-hidroxílica en 3' y 4', en la que se forman complejos sólo con el cloruro de aluminio en medio neutro; disposición que desaparece al adicionar el ácido. La presencia de ésta agrupación O-hidroxílica se demuestra por el efecto hipsocrómico en la banda A, de 30 a 40 nm del espectro con  $AlCl_3$  y HCl respecto al del  $AlCl_3$  sólo.

La técnica más utilizada consiste en efectuar varios barridos espectrofotométricos en disolución alcohólica con adición de VI gotas de  $AlCl_3$  al 5 %, y después añadir V gotas de HCl diluido a 1/3; comprobándose los efectos hipsocrómicos y batocrómicos de los distintos espectrofotogramas obtenidos, tomando como referencia el espectro realizado en medio neutro.

Tomás, 1972, ha comprobado que mediante el empleo de los reactivos indicados se pueden identificar:

Flavonas, flavonoles y glicósidos de flavonoles, flavanonas con hidroxilo libre en posición 7, y los grupos compuestos de flavanonas, flavanonoles y chalconas.

Ciertas anomalías observadas en los desplazamientos pueden utilizarse para la identificación en particular de algún flavonoide.

## 2.6. HIDROLISIS ACIDA : AGLICONAS Y AZUCARES

La hidrólisis ácida tiene por objeto romper el enlace  $-C-O-C-$ , existente en los heterósidos. Se efectúa calentando en b. m. con HCl 1 N, ó 2 N, durante un tiempo que puede oscilar entre unos minutos a unas tres horas.

Los C-glicósidos ( por ej. vitexina), en los que la molécula de azúcar y la aglicona están ligadas por un enlace  $-C-O-$ , son particularmente resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, Harborne, 1965.

La ruptura de los enlaces heterosídicos se puede producir por hidrólisis enzimática, método que se utiliza cuando se dispone de una enzima específica y que sirve para demostrarnos la naturaleza de los enlaces glicosídicos.

De los hidrolizados se extraen las agliconas utilizando disolventes no miscibles en agua, tales como eter etílico, acetato de etilo, etc.,.

A partir de los concentrados de los extractos, por sistemas cromatográficos en papel y capa fina, se pueden identificar las agliconas.

Una vez extraídas las agliconas de la disolución ácida, se utiliza ésta para la investigación de los azúcares que constituían parte de los glicósidos, neutralizando y desarrollando cromatográficamente en papel, ó en capa fina, parte de la disolución frente a azúcares puros.

## 2.7. C-GLICOSIDOS

Los derivados C-glicósidos constituyen un grupo importante dentro de las flavonas, en los que el azúcar está ligado por un enlace -C-C-, en las posiciones 6 y/ó 8. Difieren de los O-glicósidos en que estos últimos son hidrolizados como máximo en cuatro horas empleando HCl 2N y etanol, (1:1),(v:v), mientras que los C-glicósidos no se afectan, Harborne, 1965. Los C-glicósidos se pueden distinguir también de los O-glicósidos por su diferente movilidad sobre cromatogramas desarrollados en distintos eluyentes; en los 6-C-glicósidos y 8-C- glicósidos al ser calentados en medio ácido se produce una isomerización parcial, por lo que en los cromatogramas aparecen dos sustancias con distintos Rf. Cambie, 1959'.

Los espectros de los C-glicósidos son similares a los de sus correspondientes agliconas. La mayoría de los C-glicósidos están formados a partir del esqueleto estructural básico de ciertas flavonas.

Derivados C-glicosídicos más corrientes

<u>Agliconas</u>	<u>6-C-Glic.</u>	<u>8-C-Glic.</u>	<u>6-8- diC-glic</u>
Apigenina	Isovitexina	Vitexina	Violantina
Acacetina	---	Cytisósido	---
Genkwanina	Swertisina	---	---
Luteolina	Isoorientina	Orientina	---
Crisoeriol	Isoscoparina	Scoparina	---
Diosmetina	6-C-gluc.	8-C-gluc.	6-8-diC-gluc.
5-Deoxiapigenina	---	Bayina	---
5-O-Metilluteolina	---	Parkinsonina A	---
5-7-O-Metilluteolina	---	Parkinsonina B	---
7-O-Metilluteolina	Swertiajaponina	---	---

---

Los C-glicósidos contienen generalmente un sólo azúcar y pocas veces pueden contener dos, tal es el caso de la xilosil-vitexina, ó ramnosil-vitexina, que llevan conjuntamente azúcares distintos.

Pueden tener otras uniones O-glicosídicas normales, en distintas posiciones que no sean la 6 y/ó 8, por ejemplo, la vitexina-4'-ramnosido, y la isovitexina-7-O-glucósido ( Saponarina).

El I.R. ha sido empleado para la identificación de los C-glicósidos sin gran éxito. La Resonancia Magnética Nuclear es una de las técnicas apropiadas para tal fin. Horowitz, 1966, propone la estructura de la

2<sup>a</sup> - O - Xilosil - vitexina, identificada por medio de la mencionada técnica.

Se pueden identificar C-glicoflavonas sin recurrir a la R.M.N. mediante cuidadosos análisis en U.V., cromatografía en papel, capa fina y por reacciones de color. La identificación se puede confirmar por la oxidación con cloruro férrico que libera el azúcar ligado al carbono, y también haciendo reaccionar el derivado C-glicosídico con ácido iodhídrico en fenol y calentando hasta ebullición para liberar la correspondiente aglicona.

La cromatografía en papel es recomendable para la identificación de los C-glicósidos. Harborne, 1957, y Gentili y Horowitz, 1968, han hallado con distintos eluyentes los valores de R<sub>f</sub>, que se exponen en las tablas (IV) y (V).



TABLA IVRelación de Rf en distintos sistemas de C-GlicósidosHarborne, 1967.

<u>Compuestos</u>	<u>B.A.W.</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>AcOH 15%</u>	<u>PhOH</u>
Isovitexina	0,56	0,16	0,44	0,79
Vitexina	0,41	0,06	0,24	0,63
6-8 ciC-gluc.Apigenina	0,15	0,14	0,33	0,38
Ramn-Vitexina	0,45	0,54	0,80	0,82
Vitexina-4'Ramnósido	0,50	0,46	0,69	0,57

B.A.W. . Butanol-Acido acético-Agua (4.1.5).

H<sub>2</sub>O-Agua destilada.

PhOH-Fenol saturado de agua. .

Técnica monodimensional descendente.

Papel Whatman nº 1

TABLA VRelación de Rf de C-Glicósidos en distintos sistemasGentili y Morowitz. 1968.

<u>Compuestos</u>	<u>Ac. Acético</u>		<u>B.A.W.</u>	<u>AE.F.W<sup>a</sup></u>
	<u>10%</u>	<u>30%</u>	<u>20.6.15</u>	<u>10.2.3</u>
Isovitexina	0,39	0,63	0,72	0,51
Vitexina	0,20	0,46	0,63	0,43
Xilosil-Vitexina	0,65	0,74	0,62	0,39
6-8 diC-gluc.apig.	0,50	0,63	0,55	0,15
3-C-glucosil Dios.	0,13	0,42	0,58	0,39
6-C-glucosil Dios.	0,30	0,61	0,63	0,47
6-8-diC-gluc.Dios.	0,39	0,64	0,52	0,13
Isoorientina	0,27	0,56	0,55	0,38
Orientina	0,12	0,38	0,42	0,28

a.- Fase superior.

Acido Acético Glacial.

B.A.W. Butanol.Acético.Agua.

AE.F.W. Acetato de etilo, acido formico. Agua.

Técnica monodimensional descendente.

Papel Whatman nº 1

P A R T E

=====

E X P E R I M E N T A L

=====

## EXPERIMENTAL

### 3.1. PRIMERA PARTE

Adaptación previa al aislamiento e identificación de flavonoides.

#### 3.1.1 Capítulo I

CONTRIBUCION AL AISLAMIENTO DE LOS FLAVONOIDES A PARTIR DE SUS EXTRACTOS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE SEPHADEX.

#### 3.1.2 Capítulo II

INICIACION AL ESTUDIO ESPECTRAL EN U.V., Y MEDIO NEUTRO DE LAS FLAVONAS AISLADAS EN RELACION CON SUS ESTRUCTURAS.

#### 3.1.3 Capítulo III

INICIACION AL ESTUDIO ESPECTRAL EN U.V., EN MEDIO NEUTRO, DE LOS C-GLICOSIDOS EN RELACION CON SUS ESTRUCTURAS.

### 3.1. PRIMERA PARTE

#### Capítulo

r

#### 3.1.1 CONTRIBUCION AL AISLAMIENTO DE LOS FLAVONOIDES A PARTIR DE SUS EXTRACTOS CONCENTRADOS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE SEPHADEX.

Las columnas con Sephadex G-25 Medio y LH-20, son las más recomendadas para la separación inicial de un conjunto de flavonoides.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado flavonoides puros de distintas procedencias y los obtenidos por nosotros. Los adquiridos lo fueron a Fluka, Koch-Light, Merck, Roth y otras.

Se han empleado columnas de Sephadex de los tipos SR 25/45 y K 25/45, con adaptadores de flujo para disolventes orgánicos y acuosos, utilizando LH-20 y G-25 medio respectivamente.

La altura del relleno en ambos casos fué de 33 cm.

Empleamos para el desarrollo de todas las técnicas espectrofotométricas un Beckman DB-GT, con registrador BD-3 de Kipp-Zonen.

Los disolventes empleados son Probus y Merck, de calidad reactivo análisis.

Los eluyentes se preparan con los reactivos y cantidades siguientes:

- 1). Metanol-Etanol-Agua, (20:15:5) (v:v:v), al que denominamos con las iniciales M.E.A.
- 2). Metanol-Etanol-Agua, (40:30:30) (v:v:v)
- 3). Metanol-Agua, (30:10), (v:v).
- 4). Agua.

Los flavonoides se disuelven con el mismo eluyente de la columna.

Se recogen fracciones de 10 en 10 ml.

Se investiga a dos longitudes de onda (270 y 368 mμ), y analizamos sus respuestas espectrofotométricas.

El rendimiento de cada columna de Sephadex depende de una serie de detalles que es preciso tener en cuenta. Antes de rellenar la columna se pone en contacto el gel y el disolvente y se dejan en ésta frascos previa más de tres horas, tiempo sufi-

ciente para que se hinche totalmente el gel, ya que de lo contrario, al rellenar la columna sin el debido grado de hinchamiento se produce un apelmazamiento que se traduce en disminución de flujo.

En general, en todas las cromatografías la temperatura influye decisivamente sobre el desarrollo pudiendo alterar los volúmenes de elución, por lo que es conveniente referir dichos valores a una temperatura determinada, 20°C. Al aumentar ésta se observa una disminución de los volúmenes de elución.

El desarrollo de una muestra, ó serie de ellas, debe efectuarse sin pausas para no alterar los resultados.

Las muestras a analizar disueltas deben ser introducidas en volúmenes no mayores de dos ml. (se aconseja trabajar con 1 ml).

Después del desarrollo de una cromatografía se debe lavar la columna con disolución acetonal 0,001 F.

La limpieza de los accesorios de entra-



da y salida, así como la del Sephadex, son factores muy importantes para lograr un buen desarrollo cromatográfico y para seleccionar el flujo deseado. Se ha trabajado con un flujo de 4 ml por minuto.

No se debe emplear cada columna más de un mes, por lo que es aconsejable vaciarla y efectuar una limpieza a fondo después de éste tiempo.

## RESULTADOS

En la tabla VI se han agrupado los volúmenes de elución de los distintos flavonoides y de los eluyentes experimentados.

T A B L A V I  
VOLUMENES DE ELUCION EN COLUMNAS DE SEPHADEX

	LH-20			G-25 M
Flavonoides	MeOH 90%	MEA	MEA	Agua
			40.30.30	
<hr/>				
<u>Flavonas</u>				
Apigenina	270	300	---	---
Apina	200	240	220	720
Apig.7-rut.	260	220	---	450
Vitexina	210	230	---	700
Xilosil-Vitexina	210	220	---	360
Diosmina	230	230	---	510
Diosmetina	260	290	---	---
Crisceriol	280	310	---	---
Luteolina-7-rut.	230	240	---	480
Luteolina	320	370	---	---
 <u>Flavonoles</u>				
Limocitrina (agl.)	300	300	---	---
Limocitrol (agl.)	330	330	---	---
Kaempferol	370	430	470	---
Quercetina	540	520	540	---
Rutina	200	220	220	530
Quercitrina	255	230	290	460
Limocitrol-3-G.	400	370	---	---
Limocitrina-3-G.	400	400	---	---
 <u>Flavanonas</u>				
Eriodictiol	280	270	300	---
Eriocitrina	180	180	175	390
Hesperetina	300	290	310	820
Hesperidina	150	190	180	370
Naringenina	280	310	320	---
Naringina	170	180	200	370

## PRIMERA PARTE

### Capítulo

#### II

#### 3.1.2 INICIACION AL ESTUDIO ESPECTRAL EN U.V., Y MEDIO NEUTRO DE LAS FLAVONAS AISLADAS, EN RELACION CON SUS ESTRUCTURAS.

La necesidad de identificar las flavonas minoritarias implica la utilización de métodos que permitan conocer sus estructuras sin necesidad de disponer de grandes cantidades. Por ésto, la espectrofotometría en ultravioleta con el concurso de diversos reactivos alcalinos y metálicos formadores de complejos se utilizan de forma sistemática.

Hemos estudiado analíticamente gran número de espectros de flavonas en U.V., encontramos que determinadas disposiciones estructurales se traducen en un cierto número de respuestas específicas que pueden experimentar fenómenos bato e hipsocrónicos, por la presencia de ciertos sustituyentes en posiciones definidas.

Comprobamos que explicando un determinado parámetro, CRF, que proponemos como abreviación de Característica Respuesta espectral de Flavonas, y que se define como la distancia en nanómetros, en la zona comprendida entre 350 y 235 nm, desde el máximo de la mayor longitud de onda en la banda A, hasta el máximo ó inflexión, en la menor longitud de onda. Con ésta constante se pueden clasificar las flavonas en dos grandes grupos: las que tienen conjuntamente sustituyentes en 3' y 4' y las que no los poseen.

También se ha investigado el especial comportamiento espectral de las flavonas con hidroxilo en 5 y las condiciones necesarias para que se produzca tal determinado efecto específico, así como la influencia en el mismo de otros sustituyentes.

Finalmente se hace un somero estudio de los desplazamientos de los máximos en la banda A y de su relación con algunas estructuras en el anillo B.

Relación de espectros de las flavonas que han servido de base para el presente estudio (1).

#### RESULTADOS - INTERPRETACION

Las flavonas con CRF superior a 83 contienen la agrupación 3'y 4', pudiendo ser de cualquier naturaleza cada uno de los sustituyentes. (Cumplen con esta condición los espectros nºs 5,6,24,25, 26,31,32,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68, 69,70,71,72,75,76,78, y 82).

Las flavonas con CRF inferior a 83 no disponen de tal agrupación (Véase resto de los espectros no citados anteriormente).

---

(1). Geissman,1.962 ; Harborne,1967 ; Gentili y Horowitz,1968 y Mabry,1970, así como otros obtenidos por nosotros..

En los espectros en donde no existan máximos en la banda A, no puede obtenerse su CRF. (Espectros nº 1,11,29,30, y 50). Estos derivados no tienen sustituyentes en las posiciones conjuntas de 3' y 4'.

La 5-hidroxiflavona muestra un máximo de gran intensidad a 268 nm. Esta específica respuesta está presente en todas las flavonas con hidroxilo en 5, y en general está comprendida entre 267 y 269 nm; no se afecta por la presencia de hidroxilos en las posiciones 7 y 4', siempre que al menos uno de ellos co-exista con el situado en la mencionada posición 5. Lo que podemos expresar como conjunto de posiciones de hidroxilos libres condicionantes a una misma respuesta específica espectral:

$$(5,7) = (5,4') = (5,7,4') = 267 - 269 \text{ nm}$$

El efecto espectral específico, derivado de las agrupaciones anteriores, puede sufrir variaciones de tipo batocrómico ó hipsocrómico entre 265 y 285 nm.

Se producen efectos batocrómicos por la presencia de los siguientes sustituyentes:

- 1º. Los que se encuentran en posición 6, que por estar en orto, con respecto al -OH en 5, condiciona las máximas batocromías (hasta 285 nm). (Espectros nº 19, 21, 27, 28, 36, 37, 53, 54, 59, 66 y 76).
- 2º. Los situados en posición 8, en para con el -OH en 5, que influyen con una cierta batocromía, (hasta 281 nm). (Espectros nº 20, 23, 29, 38, 39, 40, 42, 63, 67 y 79).
- 3º. Los sustituyentes en posiciones 6 y 8 suelen potencializar el efecto batocrómico. (Espectros nº 41, 52, 61, 68, 73, 74, 75, 77).
- 4º. Los C-glicósidos en posiciones 6 y/ó 8, presentan discretas batocromías, dando respuestas entre 270 y 274 nm. (Espectros nº 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 52, 59, 61, 63, 66, 67, 68 y 79).
- 5º. La presencia de un grupo -CH<sub>3</sub> en las posiciones 6, 7 ó 8, en lugar de -OH, se manifiesta por una débil batocromía. (Espectros nº 10, 15, 20, 21 y 22).

Los efectos hipsocrómicos, se manifiestan:

- 1<sup>a</sup>. Por la copulación del -OH en 5, ó presencia del grupo -OH<sub>3</sub> en sustitución de éste -OH. (Espectros nº 13,17,31, y 78).
- 2<sup>a</sup>. Por la presencia conjunta de la agrupación O-dihidroxílica en las posiciones 3'y 4'. (Espectros nº 5,23,25,55,56 y 57).
- 3<sup>a</sup>. Por la presencia de un metoxilo en las posiciones 2'ó 5'. (Espectros nº 47,50 y 51).

La coexistencia de sustituyentes que producen batocromía con otros que determinan hipso-cromía pueden conducir a la anulación de tales efectos, ó a disminuir el de mayor intensidad (Espectros nº 50,57,59,60 y 61).

En escasas flavonas muy metoxiladas, carentes de sustituyentes en 7, y/ó 4', que deben ser consideradas en un grupo especial, el efecto espectral debido al -OH en posición 5 (que en estos casos también puede ser un metoxilo), está condicio-



nado por la presencia conjunta de un sustituyente en la posición 6. En estos derivados dicha respuesta estará relacionada a otro par de sustituyentes, (5,6), y teóricamente también a (5,8). Generalmente dan espectros de características diferentes al de las otras flavonas. (Espectros nº 19,50, y 51).

En la respuesta espectral del máximo en la banda A, que también está relacionada con la presencia de sustituyentes en el anillo B y con la calidad de los mismos, si tienen -OH en posición 5 (ó más raramente copulado) se puede apreciar:

1º. La respuesta desde 321 a 329 nm la muestran los derivados copulados, preferentemente en 4'. (Espectros nº 14,15,42,43,44,49,73 y 77).

Las respuestas inferiores a 330 nm pueden indicar también carencia de -OH en posición 5, ó falta de sustituyentes en el anillo B. (Como excepciones se pueden citar los espectros nº 10 y 29).

2º. La respuesta desde 330 a 339 nm está relacionada principalmente con los derivados de la Apigenina, con sustituyentes comunes en las posiciones 5,7,

4'y de sus C-glicósidos respectivos, ya sean en la posición 6 y/ú 8. Espectros nº 33,34,35,36,37,38,39, 40,41,45,46,48,52,53,54,79,80 y 81.

También las respuestas con valores próximos a 330 nm, están relacionadas con derivados metoxilados en el anillo B, tanto di como trisustituídos. (Espectros nº 6,26,31 y 72).

3º. La respuesta de 343 a 349 nm, indica la existencia de sustituyentes en las posiciones 3'4'preferentemente, de los que al menos un sustituyente es un hidroxilo. Son derivados de la luteolina con sustituyentes comunes en las posiciones 5,7, 3'y 4'. (Espectros nº 55,56,57,59,60,61,62,63, 64,65-66,67,68,69 y 78). (Como excepción el espectro nº 32).

TABLA VII

Nº	Nombre	Fórmula	Máximos	CRF
	Flavona	Flavona	307 <sup>a</sup> , 294 , 250	—
		5-OH	333 , 296 <sup>a</sup> , 268	65
-3		7-OH	307 , 268 , 252	55
4		4'-OCH3	317 , , 253	64
		3'-4'-OH	340 , 308 <sup>a</sup> , 242	98
		3'-4'-OCH3	333 , 314 <sup>a</sup> , 242	91
	Crisina	5,7,-OH	313 , 268 , 247 <sup>a</sup>	66
8		4'-OH	327 , , 251	76
		7-OCH3	310 , , 250	60
10		5-OH, 7-OCH3	337 , 271	66
11	Tectocrisina	5-OH, 7-OCH3	303 <sup>a</sup> , 267 , 248 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>
12		4'-7 -OH	328 , 312 <sup>a</sup> , 253 <sup>a</sup>	75
13		7-OH, 5-CH3	308 , , 258	56
14		5-OH, 4'-OCH3	323 , 273	50
15		5-OH, 4'-OCH3, 7-CH3	321 , 272	49
16	Pratol	7-OH, 4'-OCH3	323 , 314 <sup>a</sup> , 253	70
17		7-OH, 4'-OCH3, 5-CH3	320 , 262	58
18		4'-OH, 7-Ram-Gluc.	325 , 311 <sup>a</sup> , 255 <sup>a</sup>	70
19		5,6-OH	325 , , 300 , 270	55
20		5,7-OH, 8-CH3	321 , 273 , 251	70

(a) Inflexión.

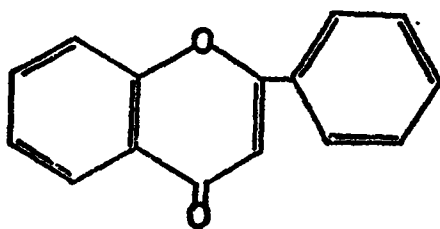
Nº	Nombre	Fórmula	Máximos	CRF
21		5-OH, 7-OCH <sub>3</sub> , 6-CH <sub>3</sub>	316 , 273 , 250	66
22		7-OH, 5-OCH <sub>3</sub>	311 , 265	46
23	Bayina	7-4'-OH, 8-C-Gluc.	328 , 312 <sup>a</sup> , 255 <sup>a</sup>	73
24		7, 3, 4'-OH	343, 309, 250 <sup>a</sup> , 235	108
25		3-4'-OH, 7-Ram-Gluc.	341, 305, 255 <sup>a</sup> , 247 <sup>a</sup>	94
26		7-OH, 3-4'-OCH <sub>3</sub>	330, 262 <sup>a</sup> , 239	91
27	Baicaleina	5, 6, 7-OH	323 , 274 , 247 <sup>a</sup>	76
28	Baicalina	5, 6, -OH, 7-Glucur.	315 , 278 , 244	71
29	Norwogonina	5, 7, 8 tri-OH	364 <sup>a</sup> , 281	—
30		5, 8-OH, 7-Glucur.	342 <sup>a</sup> , 315 <sup>a</sup> , 274, 247	—
31		7-OH, 3, 4'-OCH <sub>3</sub> , 5-CH <sub>3</sub>	330 , , 239	91
32		5-OH, 3, 4'-OCH <sub>3</sub> , 7-CH <sub>3</sub>	345 , 272 , 250	95
33	Apigenina	5, 7, 4'-OH	336 , 296 <sup>a</sup> , 267	69
34	Ap-7-gluc.	5, 4'-OH, 7-Gluc.	333 , , 268	65
35	Ap-7-Meoh.	5, 4'-OH, 7-Ramn-Gluc.	333 , , 268	65
36	Isovitexina	5, 7, 4'-OH, 6-C-G.	336 , , 271	65
37	Saponarina	5, 4'-OH, 7-Gluc, 6-C-G.	336 , , 271	65
38	Vitexina	5, 7, 4'-OH, 8-C-G.	336 , 302 <sup>a</sup> , 270	66
39	Ramn-Vitex.	5, 7, 4'-OH, 8-C-Ram-Gluc.	336 , 303 <sup>a</sup> , 270	66
40	Xil-Vitex	5, 7, 4'-OH, 8-C-Xil-Gluc.	335 , 301 <sup>a</sup> , 270	65
41	Violantina	5, 7, 4'-OH, 6-8-di-C-Gluc.	335 , 311 <sup>a</sup> , 274	61

Nº	Nombre	Fórmula	Máximos	CRF
42		5-OH, 4', 7-Et, 8-C-Gluc.	326 , , 270	56
43	Acacetina	5, 7-OH, 4'-OCH <sub>3</sub>	327, , 303 <sup>a</sup> , 269	58
44	'Ac-7-Gluc.	5-OH, 4'-OCH <sub>3</sub> , 7-Gluc.	324 , , 268	56
45		5, 4'-OH, 7-OCH <sub>3</sub>	335 , , 269	66
46	Roifolina	5, 4'-OH, 7-Gluc.	334 , , 269	65
47		5, 7-OH, 2'-OCH <sub>3</sub>	325, , 266	59
48		5, 7-OH, 4'-Gluc.	334 , , 270	64
49		5, 7, 4'-OCH <sub>3</sub>	325 , , 265	60
50	Zapotinina	5-OH, 6, 2', 5'-OCH <sub>3</sub>	348 <sup>a</sup> , 307 <sup>a</sup> , 264	--
51	Zapotina	5, 6, 2', 5'-OCH <sub>3</sub>	325, , 255 <sup>a</sup>	70
52		5, 7, 4'-OH, 6, 8 digluc.	335 , , 274	61
53	Scutelareina	5, 6, 7, 4'-OH	339 , , 286	53
54	Scutelarina	6, 7, 4'-OH, 5-Glucur.	335 , , 285	60
55	Luteolina	5, 7, 3', 4', 7-Gluc.	348, 291 <sup>a</sup> , 267, 253, 242 <sup>a</sup>	107
56	Lu-7-Gluc.	5, 3', 4'-OH, 7-Gluc.	348, 267 <sup>a</sup> , 255	93
57	Lut-7-Rut.	5, 3', 4'-OH, 7-Rut	349, 265 <sup>a</sup> , 255	94
58		5, 7, 3', 4'-OCH <sub>3</sub>	330, 264 , 244	86
59	Isorientina	5, 7, 4', 3'-OH, 6-C-G	349, 271, 255, 242 <sup>a</sup>	107
60	Orientina	5, 7, 4', 3'-OH, 8-C-G.	346, 293 <sup>a</sup> , 267, 255	91
61	Lucenina 1	5, 7, 4', 3'-OH, 6-8-di-C-G.	349, 272, 257	92
62	Crisoeriol	5, 7, 4'-CH, 3'-OCH <sub>3</sub>	347, 269, 249 <sup>a</sup> , 241	106
63	Scoparina	5, 7, 4'-OH, 3'-OCH <sub>3</sub> , 8-C-G.	345, 270, 251	94

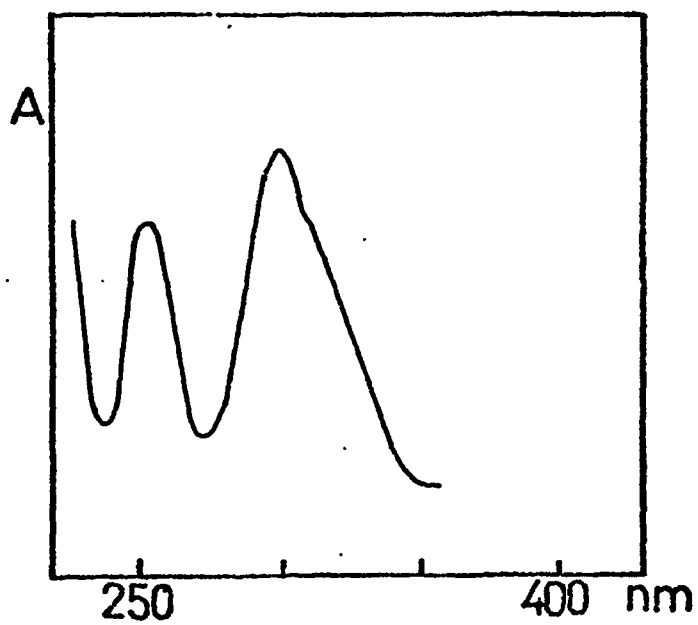
Nº	Nombre	Fórmula	Máximos	CRF
64	Diosmetina	5,7,3'-OH,4'-OCH <sub>3</sub>	344,291 <sup>a</sup> ,267,252,240 <sup>a</sup>	104
65	Diosmina	5,3'-OH,4'-OCH <sub>3</sub> ,7-R.G.	345, ,268,255	90
66	Dios-6-C-G.	5,7,3'-OH,4'-OCH <sub>3</sub> ,6-C-G.	344,272,253	91
67	Dios-8-C-G.	5,7,3'-OH,4'-OCH <sub>3</sub> ,8-C-G.	343,290 <sup>a</sup> ,272,252	91
68	Dios-6,8diC-G.	5,7,3'-OH,4'-OCH <sub>3</sub> , 6-8-diC-Gluc.	344,274, 257 <sup>a</sup>	87
69		5,4'-OH,7,3'-OCH <sub>3</sub>	348,266,252	96
70		3'-OH,5,7,4'-OCH <sub>3</sub>	334, ,245	89
71	Tricina	5,7,4'-OH,3',5'-OCH <sub>3</sub>	350,299 <sup>a</sup> ,269,244 <sup>a</sup>	106
72		5,7-OH,3',4',5'-OCH <sub>3</sub>	331,310 <sup>a</sup> ,270,240 <sup>a</sup>	91
73	Navadensina	5,7-OH,6,8,4'-OCH <sub>3</sub>	329,284	45
74	Xantomicrol	5,4'-OH,6,7,8-OCH <sub>3</sub>	332,294 <sup>a</sup> ,281	51
75	Hymenoxina	5,7-OH,6,8,3',4'-OCH <sub>3</sub>	336,279,250	86
76	Sinensetina	5,6,7,3',4',-OCH <sub>3</sub>	328,265,240	88
77	Tangeretina	5,6,7,8,4'-OCH <sub>3</sub>	321,271	50
78	Lu-5-gluc.	7,3',4'-OH,5-Gluc.	344,303 <sup>a</sup> ,263 <sup>a</sup> ,252 <sup>a</sup> , 242.....	102
79	Vit-4'-Ram.	5,7-OH,4'-Ramm,8-C-Gluc.	332,302 <sup>a</sup> ,271	61
80	Ap-7-gluc.	5,4'-OH,7-Gluc.	336,268,261 <sup>a</sup>	75
81	Apiina	5-4'-OH,7-Eluc.	337,268	69
82	Nobiletina	5,6,7,8,3',4'-OCH <sub>3</sub>	332,272,248	84

Espectro nº1

FLAVONA



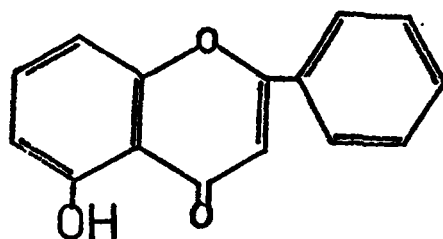
MeOH —————



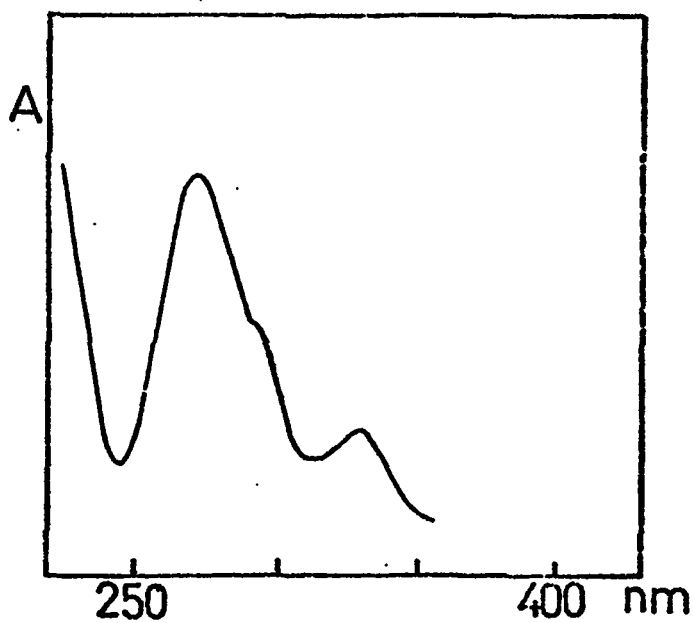
CRF ———

## Espectro nº 2

## 5-HIDROXIFLAVONA



MeOH \_\_\_\_\_

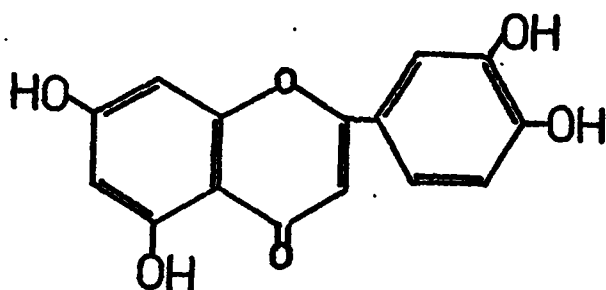


CRF &lt; 83 (=65)

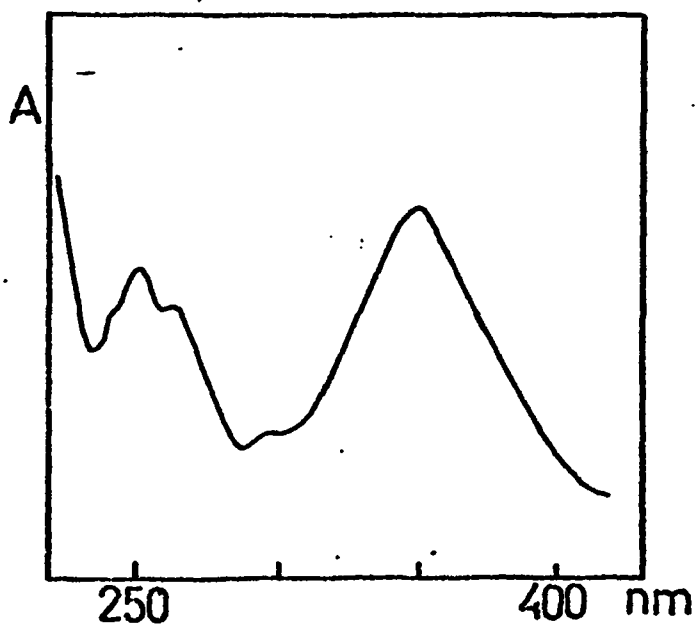


Espectro nº 55

LUTEOLINA

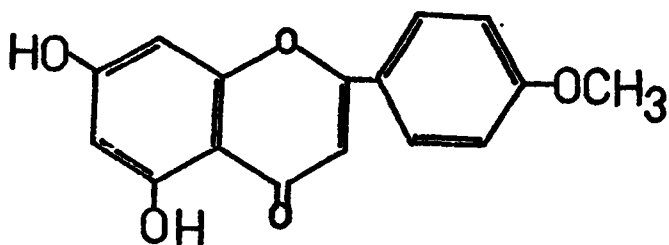


MeOH \_\_\_\_\_

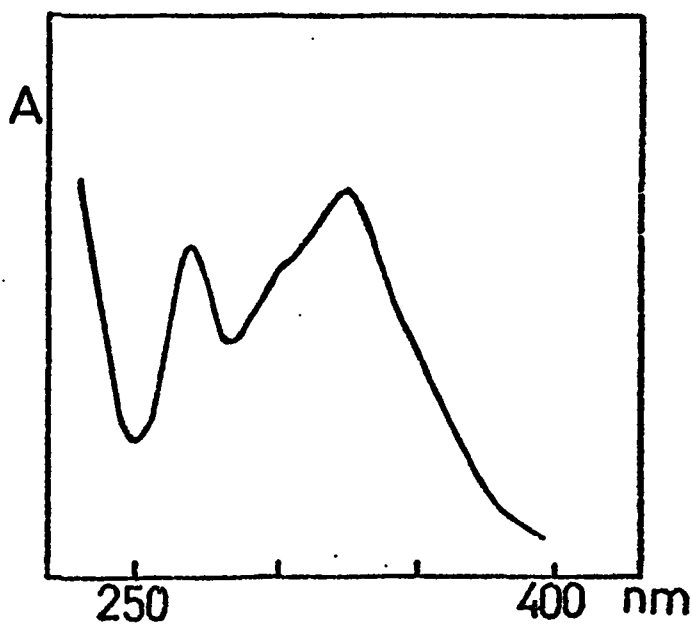


CRF > 83 (=107 )

## Espectro nº43

ACACETINA

MeOH \_\_\_\_\_



CRF &lt; 83 (= 58 )

## PRIMERA PARTE

### Capítulo

### III

#### 3.1.3 INICIACION AL ESTUDIO ESPECTRAL EN U.V., Y MEDIO NEUTRO DE LOS C-GLICOSIDOS EN RELACION CON SUS ESTRUCTURAS.

Los C-Glicósidos de las flavonas, disueltos en medio neutro, presentan unas peculiares respuestas espectrales en el ultravioleta, que debidamente analizadas, pueden constituir la base para su clasificación y posible identificación.

El parámetro DEM que consideramos (distancia entre los máximos más representativos en cada una de las bandas A y B), puede ser un elemento auxiliar en el conocimiento de estos compuestos.

#### RESULTADOS - INTERPRETACION

- 1º. Toda flavona con una R-5 expresada por un máximo entre 270 y 274 nm, debe ser clasificada en un principio como un derivado C-glicosídico, en las posiciones 6 y/ó 8.
- 2º. Si el máximo en la banda A se muestra entre 326 y 338 nm. es un derivado de la apigenina.
- 3º. Si está expresado entre 342 y 350 nm es un derivado con sustituyentes en 3'y 4'.
- 4º. Por el valor del parámetro DEM podemos deducir:
  - a) De 56 a 66: Derivados de la Apigenina
  - b) De 70 a 72:               "               "       " Diosmetina
  - c) De 75 a 76:               "               "       " Crisoeriol
  - d) De más de 76:             "               "       " Luteolina

- 5<sup>a</sup>. En general, si se aprecia una inflexión entre 290 y 312 indica que en la posición 8 existe una unión C-glicosídica.
- 6<sup>a</sup>. La identificación de la Orientina (346,293<sup>a</sup>,267,255), pese a su R-5 de 267 nm, está basada en la observación de que sólo ciertos C-glicósidos tienen un espectro caracterizado por presentar una inflexión entre 290 y 295,nm seguida a menor longitud de onda de dos respuestas únicas expresadas como máximos.

La propiedad de los C-glicósidos de no hidrolizarse por los métodos normales debe servir también de guía para su caracterización.

T A B L A VIIIC-GLICOSIDOS

<u>Nº</u>	<u>Nombre</u>	<u>Fórmula</u>	<u>Máximos e inflex</u>	<u>DEM</u>	<u>CRF</u>
1		5-OH, 4', 7-diEt, 8-C-gluc.	326, 270	56	56
2		5, 7-di-OH, 4'-Ramn, 8-C-gluc.	332, 303 <sup>a</sup> , 271	61	61
3	Isovitexina	5, 7, 4'-OH, 6-C-gluc.	336, 271	65	65
4	Saponarina	5, 4'-OH, 7-gluc, 6-C-gluc.	336, 271	65	65
5	Vitexina	5, 7, 4'-OH, 8-C-gluc.	336, 303 <sup>a</sup> , 270	66	66
6	Ramn-Vitex.	5, 7, 4'-OH, 8-C-Ramn-gluc.	336, 303 <sup>a</sup> , 270	66	66
7	Xil-Vitexina	5, 7, 4'-OH, 8-C-Xil-gluc.	335, 301 <sup>a</sup> , 270	65	65
8	Violantina	5, 7, 4'-OH, 6, 8-diC-gluc.	335, 311 <sup>a</sup> , 274	61	61
9	Diosm-6-8-	5, 7, 3'-OH, 4'-OCH <sub>3</sub> , 6, 8-diC-			
	-di-C-gluc.	glucósido.	344, 274, 257 <sup>a</sup>	70	87
10	Diosm-8-C-g.	5, 7, 3'-OH, 4'-OCH <sub>3</sub> , 8-C-gluc.	343, 290 <sup>a</sup> , 272, 252	71	91
11	Scoparina	5, 7, 4'-OH, 3'-OCH <sub>3</sub> , 8-C-gluc.	345, 270, 251	75	94
12	Diosme-6-C-g.	5, 7, 3'-OH, 4'-OCH <sub>3</sub> , 6-C-gluc.	344, 272, 253	72	91
13	Lucenina 1	5, 7, 3', 4'-OH, 6-8-diC-gluc.	349, 272, 257	77	92
14	Isoorientina	5, 7, 3', 4'-OH, 6-C-gluc.	349, 271, 255, 242 <sup>a</sup>	78	107
15	Orientina	5, 7, 3', 4'-OH, 8-C-gluc.	346, 293 <sup>a</sup> , 267, 255	79	91
16	Bayina	7, 4'-OH, 8-C-gluc.	328, 312 <sup>a</sup> , 255 <sup>a</sup>	--	73

Respuestas tomadas de Geissman, 1962, Gentili y Horowitz, 1968 y Mabry, 1970, y de las obtenidas por nosotros.

3.2 SEGUNDA PARTE

3.2.1 Investigación de la DOTACION FLAVONOIDEA en el  
Citrus Limonum var. EUREKA. Sistemática seguida.

Capítulo I

3.2.2 HOJA

Capítulo II

3.2.3 CORTEZA

Capítulo III

3.2.4 FLOR

SEGUNDA PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. ESTUDIO DE LA DOTACION FLAVONOIDEA DEL C. LIMONUM.

VAR. EUREKA (Sistemática seguida).

- I.- Hoja
- II.- Corteza
- III.- Flor

Hemos adoptado la sistemática siguiente para el estudio de los flavonoides, en cada una de las partes u órganos del C.Limonum, var. Eureka:

- A.- OBTENCION DE UN EXTRACTO CONCENTRADO RICO EN FLAVONOIDES.
- B.- AISLAMIENTO DE LAS FRACCIONES FLAVONOIDEAS CONTENIDAS EN EL EXTRACTO.
- C.- PURIFICACION DE LAS FRACCIONES AISLADAS.
- D.- ESTUDIO DE LOS FLAVONOIDES AISLADOS Y PURIFICADOS COMO GLICOSIDOS.



E.- ESTUDIO EN EL HIDROLIZADO DE LAS FRACCIONES  
PURAS DE LAS AGLICONAS Y LOS AZÚCARES ESCIN-  
DIDOS.

F.- HIDROLISIS ALCALINA PARA IDENTIFICAR EL  
ANILLO B.

G.- RESUMEN DATOS OBTENIDOS

Antes de pasar a describir los procedimientos que hemos empleado, se aclara que algunas de las técnicas han sido ya expuestas en los respectivos apartados de los antecedentes, por lo que estimamos sería reiterativo volver sobre el mismo tema. Sólo en los casos que consideremos oportuno haremos mención de alguna técnica.

A.- OBTENCION DE UN EXTRACTO CONCENTRADO RICO EN  
FLAVONOIDES

A.1.- Inactivación enzimática del producto vegetal  
fresco.

Para tal fin se aprovecha la operación de desecación del material vegetal, una vez lavado el mismo, deshidratándolo en corriente de aire caliente, a 60°C, durante doce horas.

El material vegetal desecado, se pulveriza antes de someterlo a las técnicas de extracción.

A.2.- Purificación del material por tratamiento con  
disolventes no polares.

El material vegetal, inactivado y pulverizado, se introduce en cartuchos de papel de filtro perfectamente cerrados. En Soxhlet se trata con éter de petróleo (40-60°C), hasta que no se observe extracción de color por el disolvente.

Cuando el material vegetal sea rico en clorofilas, como las hojas verdes, se extrae seguidamente con tricloroetileno.

**A.3.- Obtención del extracto alcohólico y concentración del mismo**

A continuación del tratamiento con disolventes no polares, se comienza la extracción con alcohol metílico del 96 % y se continua hasta que no se observe extracción de color. Este tratamiento suele durar unas veinte horas.

El concentrado del extracto metanólico se consigue por medio de un Rotovapor, trabajando entre 0 y 50°C.

**B.-  AISLAMIENTO DE LAS FRACCIONES FLAVONOIDEAS CONTENIDAS EN EL EXTRACTO.**

**B.1.- Cromatografía en columna de Sephadex.**

De 1 a 2 ml del extracto concentrado se hacen pasar por columna con Sephadex G-25 Medio y agua como eluyente, recogiendo fracciones de 10 en 10 ml.

Se seleccionan las fracciones significativas por medio de barridos espectrofotométricos. Esta columna es especialmente apropiada para la separación de los C-glicósidos.

Para la separación de los demás glicósidos se ha empleado la columna con Sephadex LH-20 y MEA como eluyente, siguiendo la misma técnica anterior.

#### B.2.- Identificación preliminar de los Flavonoides

Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, con barridos espectrofotométricos similares, se reúnen y concentran en Rotovapor. Si se forman precipitados en esta operación, se separan por filtración y se estudian por espectrofotometría y cromatografía, cada uno de ellos por separado. En este momento se recurre a los diferentes tipos de reacciones de color para obtener la mejor información de cada una de las fracciones.

#### B.3.- Empleo de la cromatografía preparativa sobre papel Whatman 3 MM.

Los concentrados de los extractos, ó los precipitados, obtenidos según se describió anteriormente, son tratados por cromatografía preparativa sobre papel Whatman 3 MM y ac. acético al 15 %, como líquido de desarrollo. Terminada ésta, que suele durar entre 6 y 8 horas, se secan las tiras de papel y se obser-

van a la luz ultravioleta a 360 y 254 nm.

Por haber extendido el producto en el espacio de partida de forma lineal se observan después del desarrollo distintas bandas, delimitándose cada una de ellas con un lápiz. Se recortan algunas tiras de papel en el mismo sentido del desarrollo, para tratarlas con distintos reactivos coloreados, a fin de poder detectar la presencia de ciertas bandas que, tanto en el visible como en el ultravioleta no se hubieran podido apreciar.

Cada una de las bandas separadas, debidamente recortada, se eluyen con metanol 90 %. Los eluatos que se obtienen se estudian por espectroscopía en U.V. y reacciones de color, y se someten a una segunda cromatografía, con la misma clase de papel y el eluyente T B A (tert-butanol, ac. acético, agua, (3:1:1) (v:v:v), se continúa del modo ya descrito. En ciertos casos, al llegar a este momento, se pueden obtener las sustancias aisladas lo suficientemente puras para iniciar los análisis de identificación.

## C.- PURIFICACION DE LAS FRACCIONES AISLADAS.

### C.1.- Por recromatografía sobre papel y diversos eluyentes.

Si las fracciones aisladas por los procedimientos anteriores estan acompañadas de impurezas ó de otros flavonoides, se hace preciso someterlas a otros procesos de purificación. Generalmente realizamos dos series de cromatografías preparativas en papel Whatman 3MM con los sistemas de eluyentes que citamos:

1º Con Ac. acético a diversas concentraciones, según los casos.

2º Con B.A.W ó T.B.A según los casos.

## D.- ESTUDIO DE LOS FLAVONOIDES AISLADOS Y PURIFICADOS

### D.1.- Reacciones de color para su identificación por grupos.

Por medio de las reacciones de color podemos saber, inicialmente, si el derivado flavonoideo es : Flavona; flavonol, flavanona ó chalcona. (Véase cuadro de reacciones de color en la pags 22 y 23).

D.2.- Estudio inicial espectrofotométrico en U.V. en medio neutro.

-OH libre en 5

Se detecta por el máximo específico en la banda B entre 265 y 285 nm, menos frecuentemente por una inflexión.

- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4'

Se reconoce tal circunstancia por el valor de los respectivos CRF, que si es mayor de 83, expresa la presencia de sustituyentes en dichas posiciones.

- Sustituyentes en 6 y/ó 8.

Se reconoce tal presencia por el efecto batocrómico que experimenta la R-5, superior a 269 nm.

- C-glicósidos

Una vez identificada una sustancia como flavona, si su R-5 está entre 270 y 274 nm nos indica la pertenencia a éste grupo.

Para completar el estudio de estos compuestos, tendremos en cuenta los resultados sobre los mismos expuestos anteriormente.

### Esqueleto estructural básico.

Por medio del valor de la respuesta en la banda A, se puede conocer el esqueleto estructural básico de las flavonas:

- a) Si está constituida la banda A por una inflexión, indica carencia de sustituyentes en el anillo B.
- b) Si está formada por un máximo puede ser:
  - Inferior a 330 nm, indica carencia de sustituyentes en el anillo B.
  - Entre 330 y 339 nm, está en relación con los derivados de la Apigenina.
  - Y entre 343 y 349 nm, están relacionadas con el grupo de la Lutcolina.

### D.3.- Estudio espectral en ultravioleta por medio de reactivos alcalinos.

Con los reactivos alcalinos, se puede conocer la existencia de:



- Hidroxilo libre en 4'

a) Con metilato sódico se observa desplazamiento batocrómico en banda A, de 40 a 65 nm; sin decrecer en intensidad.

b) Con acetato sódico no fundido, si no existen los -OH en 3 ó 7 puede haber una inflexión en la mayor longitud de onda (Banda A).

c) Con acetato sódico fundido, exento de ac.acético, se obtiene un máximo similar al obtenido con MeONa.

d) Con amoníaco el desplazamiento batocrómico en la banda A es superior a 15 nm.

- Hidroxilo libre en 7.

a) Con acetato sódico, se observa un desplazamiento batocrómico de 5 a 20 nm en la banda B.

b) Con  $\text{NH}_3$ . Desplazamiento batocrómico en banda B, de 7 a 22 nm.

D.4.- Estudio de espectros en ultravioleta por medio de reactivos metálicos y con  $\text{AcONa}/\text{BO}_3\text{H}_3$ .

Con los reactivos metálicos, se puede conocer la existencia de:

- Agrupación O-dihidroxílica

a) con  $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$ . - Desplazamiento hipsocrómico en la B.A. de 30 a 40 nm, frente al espectro del  $\text{Cl}_3\text{Al}$ .

b) con  $\text{AcONa}/\text{BO}_3\text{H}_3$ . - Desplazamiento batocrómico en la B.A. de 12 a 30 nm, frente al espectro en metanol.

**D.5.- Ensayos de comprobación cromatográficos.**

Utilizando papel Whatman nº 1 y cromatografía en capa fina (poliamida, celulosa, gel de sílice, etc.) con diversos eluyentes, se obtienen datos identificativos, frente a patrones puros.

**E.- ESTUDIOS EN EL HIDROLIZADO DE LAS FRACCIONES PURAS, DE LAS AGLICONAS Y LOS AZUCARES ESCINDIDOS.**

**E.1.- Hidrólisis ácidas de las fracciones aisladas**

Las fracciones aisladas se someten a hidrólisis en baño maría con 1 vol. de  $\text{ClH}$  2 N más 1 volumen del eluato alcohólico para estudiar las agliconas, así como los azúcares que estuvieran ligados. Terminada la hidrólisis, se extraen las agliconas con

éter etílico y seguidamente con acetato de etilo. Las agliconas de los O-glicósidos deben estar en el extracto de éter etílico. Si en este no se encuentran, y si se hallan flavonoides en el extracto de acetato de etilo, lo más probable es que sean C-glicósidos.

En los líquidos acuosos se estudian los azúcares.

En todos los casos se emplea la cromatografía en papel y capa fina, preferentemente frente a patrones puros, seguido en los casos que sea preciso, de estudio espectrofotométrico en U.V. de las agliconas.

#### **F.- HIDROLISIS ALCALINA PARA IDENTIFICAR EL ANILLO B.**

##### **F.1.- Hidrólisis alcalina.**

Una fracción pura y desecada, del orden de 0,5 a 1 mg, se mezcla con 1 ml de KOH al 40 %, y se hierve durante 40 min. Se acidifica con ClH y se extrae con éter etílico (15 ml x 2). La disolución etérea se trata con disolución de bicarbonato al 8 %. Estos líquidos se acidifican y vuelven a extraerse con éter etílico. Se concentran y cromatografían en placa de gel de sílice, con distintos eluyentes, frente a derivados puros de ácidos fenólicos.

## G.- ANALISIS COMPARATIVO DE DATOS

### G.1.- Estudio analítico

Co el fin de afirmar definitivamente la identificación de un compuesto, se comparan las distintas conclusiones sobre su estructura.

3.2.2. I. H O J A  
=====

## SEGUNDA PARTE

### I.-HOJA

Las hojas adultas, lavadas para eliminar restos de insecticidas y secadas a 50°C., se trituran, tamizan y se extraen en Soxhlet con éter de petróleo de la fracción 40-60°C, y seguidamente con tricloroetileno para eliminar grasas, ceras, clorofilas y clorofilinas. A continuación se extrae con metanol durante 24 horas.

Los extractos alcohólicos se dejan enfriar en frascos tapados, a temperatura ambiente, formándose un precipitado blanquecino que se separa por filtración. Los líquidos filtrados se concentran a sequedad, a baja temperatura (en Rotovapor a menos de 50°C).

El extracto seco se trata con una pequeña cantidad de agua destilada para redisolverlo parcialmente. Unos dos ml de éste extracto acuoso debidamente filtrado se introducen en una columna de cromatografía rellena de Sephadex G-25 Medio, y co-

mo eluyente se emplea agua destilada. Las fracciones se recogen de 10 en 10 ml.

Los conjuntos de fracciones más significativas son:

1ª.-	FRACCIONES	30-45
2ª.-	"	46-60
3ª.-		61-75

Cada uno de este conjunto de fracciones se evaporan a sequedad. El residuo se redisuelve en metanol y se someten a cromatografía preparativa con papel Whatman 3 MM, utilizando la técnica monodimensional descendente y como líquidos de desarrollo ácido acético al 15 % y T.B.A. 3.1.1. (butanol terciario-ácido acético-agua), para cada una de las fracciones anteriormente aisladas.

## 12.- FRACCIONES 30-45

=====

TABLA IXConjunto de valores de los Rf y espectros en U.V.

<u>Fracción</u>	<u>Rf Ac. Acético 15%</u>	<u>Rf T.B.A 3.1.1</u>	<u>Máximos en inflexio- nes en nm.- Metanol.</u>
A	0,31	0,40	347,287 <sup>a</sup> ,267,254
B 1	0,56	0,20	344,272 <sup>a</sup> ,254,244 <sup>a</sup>
B 2	0,56	0,32	334,309 <sup>a</sup> ,273
C	0,70	0,52	335,303 <sup>a</sup> ,272
D	0,80	0,54	328,286

TABLA XReacciones de color:

<u>Fracción</u>	<u>Vis.</u>	<u>U.V.</u>	<u>AlCl<sub>3</sub></u>	<u>Neu</u>	<u>Mg+HCl</u>	<u>Bencidina Diazotada</u>
A	inc.	oscuro	amar.	amar.	amar.	----
B 1	inc.	oscuro	amar. pál.	amar. verd.	amar.	----
B 2	inc.	oscuro	amar. verd.	amar. verd.	amar.	----
C	inc.	oscuro	amar.	amar. verd.	amar.	----
D	inc.	algo oscuro	verd.	amar. verd.	rojo	rojo ladrillo.



FRACCION A

De forma preparativa se recromatografía sobre Whatman nº1 y ac. acético 40 %.

Se separan tres sustancias con los siguientes Rf y color con reactivo de Neu:

A1 =	0,62	-	Amarillo
A2 =	0,68		Verde claro
A3 =	0,80	-	Blanquecino

Siendo sólo las dos primeras significativas.

Substancia A1 :Reacciones de color:

Presenta respuesta típica de flavona.

Estudio espectral:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	345, 265, 253 <sup>a</sup>
NaOMe	401, 290 <sup>a</sup> , 270
AlCl <sub>3</sub>	415, 365, 295 <sup>a</sup> , 265
AlCl <sub>3</sub> /HCl	390, 355, 293 <sup>a</sup> , 264
NaOAc	400, 320 <sup>a</sup> , 282 <sup>a</sup> , 269 , 253 <sup>a</sup>
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	355, 276 <sup>a</sup> , 267 , 253 <sup>a</sup>

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en 5 : Positivo (R-5 = 267 nm)  
(R-5 = Respuesta típica del hidroxilo en 5).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4': Positivo.  
CRF > 83
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : No tiene.
- C-glicósido en 6 y/ó 8 : No tiene
- Esqueleto estructural básico: De un derivado de la Lu-teolina, es decir , con dos sustituyentes en 3' y 4' (Máximo de la banda A, 345 nm).

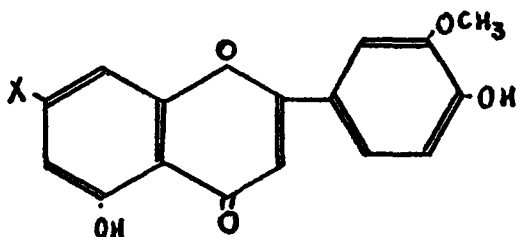
Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo libre en 4': Positivo.
- Hidroxilo libre en 7 : Negativo.

Con  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  y  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ :

- Hidroxilo en 5 libre : Positivo.
- Agrupación O-hidroxílica libre en 3' y 4': Negativo.

Estructura más probable: De un derivado del crisoeriol.



Cromatografía sobre papel.

Whatman nº 1

Técnica monodimensional ascendente

Saturación 1 hora.

Valores de los Rf de la Substancia A<sub>1</sub>:

<u>Eluyentes</u>	<u>Substancia A</u>
Ac.Acético 10 %	0,18
B.A.W 4.1.5	0,56
Ac.Acético 30 %	0,58.

RESUMEN:

En la substancia A<sub>1</sub>, debido a que existe en muy pequeña cantidad de momento no ha sido posible practicar otras reacciones de comprobación.

Por todo ello Creemos se trata de un glicósido en posición 7 de Crisoeriol.

Substancia A<sub>2</sub>

Dá reacciones coloreadas de flavonas.

Estudio espectrofotométrico en U.V.:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	345, 267, 251, 240 <sup>a</sup>
NaOMe	400, 290 <sup>a</sup> , 269, 255 <sup>a</sup>
AlCl <sub>3</sub>	385 <sup>a</sup> , 360, 293, 273 <sup>a</sup> , 263
AlCl <sub>3</sub> /HCl	383 <sup>a</sup> , 355, 293, 275 <sup>a</sup> , 264
NaOAc	405, 290 <sup>a</sup> , 263, 253 <sup>a</sup>
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	350, 295 <sup>a</sup> , 253

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en 5 : Positivo ( R-5 = 267 nm).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4': Positivo (CRF > 83),
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : Poco probable.
- Esqueleto estructural básico: De un derivado de la luteolina, es decir con dos sustituyentes en 3' y 4' (Máxima respuesta en la banda A, 345 nm).

Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo libre en 4': Positivo.
- Hidroxilo libre en 7 : Negativo.

Con AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl y NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>:

- Agrupación O-hidroxílica libre en 3' y 4': Negativo.

Por cromatografía sobre papel Whatman nº1 y técnica monodimensional ascendente, se aprecian los siguientes Rf:

Ac. acético 10 %	0,20
B.A.W. 4.1.5.	0,60
Ac. acético 30 %	0,64

#### Hidrólisis ácida:

En el extracto etéreo se identifica una aglicona, que por cromatografía en placas de gel de sílice, con benceno-dioxano-ac. acético (90.25.4), se desplaza una sustancia con Rf de 0,47, frente a patrón de apigenina que proporciona un Rf de 0,40.

Aislada la aglicona mediante cromatografía preparativa con papel Whatman 3MM frente a ac. acético al 15 % y T.B.A.

#### Estudio espectrofotométrico en U.V. de la aglicona:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexión en nm</u>
Metanol	347, 269 ,249 <sup>±</sup> , 242
NaOMe	405, 329 <sup>±</sup> ,275 <sup>±</sup> , 263
AlCl <sub>3</sub>	390, 365 <sup>±</sup> ,295 , 275, 262
AlCl <sub>3</sub> /HCl	386, 364 ,293 , 275, 259
NaOAc	395, 321 ,271
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	350, 268
(±) = Inflexión.	

En medio neutro:

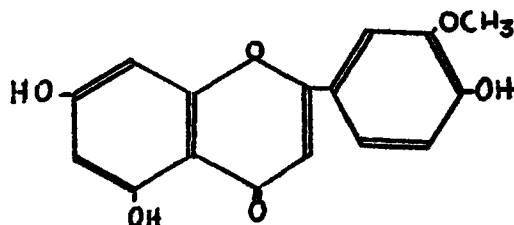
- Hidroxílo en posición 5 : Positivo ( $R-5 = 269$ ).
- Sustituyentes en las posiciones conjuntas 3' y 4':  
: Positivo. ( $CRF > 83$ ).
- Sustituyentes en 6 y/ú 8 : Poco probable.
- C-glicósido en 6 y/ú 8 : Poco probable.
- Esqueleto estructural básico: Derivado de la Luteolina.

Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilos en 4' libre : Positivo.
- Hidroxílo en posición 7 libre : Positivo.

Con  $AlCl_3$  ,  $AlCl_3/HCl$  y  $NaOAc/H_3BO_3$ :

- Agrupación O-hidroxílica libre en 3' y 4': Negativo.

Estructura más probable: CrisoeriolAnálisis cromatográfico de la aglicona:

Por las técnicas habituales, se obtienen los  $R_f$  para la aglicona problema y que comparando los obtenidos para el crisoeriol puro, resulta ser un compuesto idéntico:

<u>Valores de los Rf</u>	<u>Aglicona</u>	<u>Crisoeriol</u>
Ac. acético 50 %	0,55	0,55
B.A.W. 4.1.5	0,81	0,80
T.B.A.	0,80	0,80

Análisis de azúcares en la fracción acuosa del hidrolizado :

Se aprecia una sóla fracción de azúcar.

<u>Eluyentes</u>	<u>Azúcar A2</u>	<u>Glucosa</u>	<u>Ramnosa</u>	<u>Xilosa</u>
1	0,20	0,20	0,65	0,43
2	0,28	0,27	0,52	0,26
3	0,48	0,47	0,63	0,43

Eluyente 1 : Acetato de etilo. Isopropanol. Agua.

( 65. 23,4 . 11,7). Whatman nº 1.

Eluyente 2 : Cloroformo. Metanol. Agua. (64.36.8).

Soporte : placas de gel de sílice.

Eluyente 3 : Acetato de etilo. Metanol. Ac. acético.

Agua. (60.15.15.10). Soporte : placas de gel de sílice.

Hidrólisis alcalina :

1 ml de KOH al 45 % más el extracto de la aglicona se colocan en estufa a 120°C una hora. Se neutraliza el residuo alcalino con HCl 3N. Se enfría y extrae con éter etílico ( 2 x 15 ml). Reunidos los líquidos etéreos se extrae con bicarbonato sódico al 8% (2 x 15 ml). Los líquidos bicarbonatados se acidifican

hasta pH = 5. Nuevamente se extrae con éter etílico ( 2 X 15 ml). Estos líquidos se llevan a sequedad y se redissuelve con unas gotas de metanol; esta disolución contiene el ácido problema; se sigue un proceso cromatográfico frente a los derivados de ácidos fenólicos que nos sirven como testigos.

#### Análisis cromatográfico:

Placas de gel de sílice.

Eluyente 1 : Benceno.Dioxano. Ac.Acético 90.25.4 .

" 2 : Benceno. Metanol.Ac.Acético 45. 8.4 .

#### Valores de los Rf hallados:

<u>Eluyentes</u>	<u>Problema</u>	<u>Ac.Vaníllico</u>	<u>Ac. Protocatéguico</u>
1	0,54	0,54	0,32
2	0,61	0,61	0,40

Se reconoce el derivado problema como ácido vaníllico.

#### RESUMEN:

Se identifica el compuesto A<sub>2</sub> como un 7-glucósido del Crisoeriol.



FRACCIÓN B1Reacciones de color:

Sustancia con carácter de flavona.

Estudio espectrofotométrico en U.V.

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	344, 272 , 254 , 244a
NaOMe	399, 340a, 302a, 281a, 268
AlCl <sub>3</sub>	345, 295a, 268, 258
AlCl <sub>3</sub> /HCl	344, 295a, 267, 257
NaOAc	395, 320 , 281, 268a
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	340, 273 , 267a
H <sub>3</sub> N	375, 285 , 272

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en 5: Positivo (R-5 = 270 nm).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4': Positivo (CRF > 83).
- Sustituyentes en 6 y/u 8: Posible (R-5 = 270 nm).
- C-glicósido en 6: Muy probable (Falta de inflexión a 290 nm).
- Esqueleto estructural básico: De un derivado de la luteolina, es decir con dos sustituyentes en 3' y 4'. (Máxima respuesta en la banda A, 344 nm).
- Esqueleto estructural más probable: De un C-glicósido en posición 6, derivado de la diosmetina. (DEM = 72).

Con reactivos alcalinos:

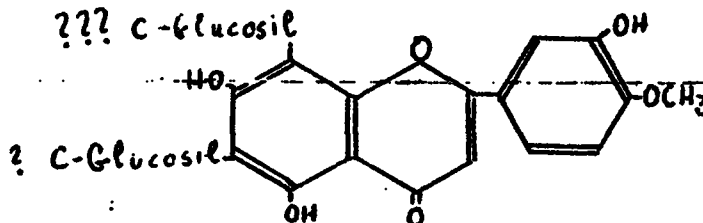
-Hidroxilo libre en 4' : Negativo.

-Hidroxilo libre en 7 : Positivo.

Con  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  y  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ :

Agrupación O-dihidroxílica libre en 3' y 4': Negativo

Estructura probable: De un C-glicósido de diosmetina:

Cromatografía sobre papel.

Whatman nº 1.

Técnica unidimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de los  $R_f$  de la fracción B1, y de los compuestos puros 6-C-glucosil Diosmetina y 8-C-glucosil Diosmetina:

<u>Eluyentes</u>	<u>B 1</u>	<u>6-C-g.(1)</u>	<u>8-C-g.(2)</u>
B.A.W 20.6.15	0,67	0,68	0,58
B.A.W 4.1.5	0,20	0,20	0,12
Ac.acético 10 %	0,30	0,30	0,13
Ac.Acético 30 %	0,60	0,61	0,42
AE.F.W 10.2.3 (&)	0,47	0,48	0,39

(1) Gentili y Horowitz, 1968.

(2) Gentili y Horowitz, 1968.

B.A.W = Butanol normal. Acido acético. Agua.

AE.F.W = Acetato de etilo. Acido fórmico. Agua.

(&) = Fase superior.

### Hidrólisis ácida

Se parte de volúmenes iguales de la disolución alcohólica del problema y de HCl 2N, y se tratan en b.m. hirviendo durante dos horas. Se enfría y se extrae primero con éter etílico y seguidamente con acetato de etilo.

En el extracto de éter etílico, no se observan agliconas; en el de acetato de etilo se comprueba la presencia de flavonoides por espectrofotometría. Por cromatografía sobre Whatman nº1, se obtienen los siguientes valores de Rf:

Eluyentes	Fracc. B1'	Fracc. B1"	(1)	(2)
			6-C-glucosil Diosm.	8-C-glucosil Diosm.
B.A.W 20.6.15	0,67	0,57	0,68	0,58
B.A.W 4.1.5	0,20	0,12	0,20	0,12
Ac.Acético 10 %	0,30	0,12	0,30	0,13
Ac.Acético 30%	0,47	0,38	0,48	0,39

(1 y 2) Valores obtenidos por Gentili y Horowitz 1968.

La fracción B1' se comporta cromatográficamente igual a la B1, y a la 6-C-glucosil

Diosmetina. La fracción B1" tiene idénticos valores de Rf que la 8-C-glucosil Diosmetina.

Análisis de azúcares en la fracción acuosa del hidrolizado.

Resultado : Negativo.

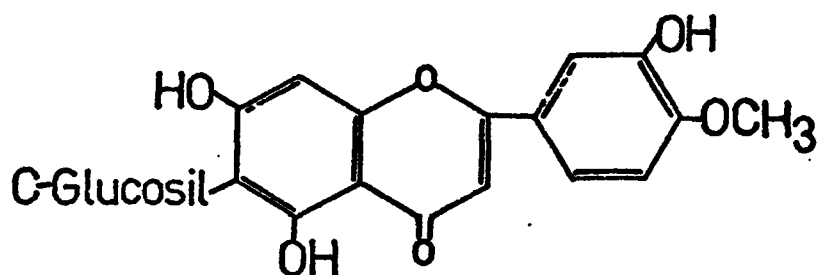
RESULTADO FINAL.-

La fracción B1, se identifica como el 6-C-glucósido de Diosmetina.

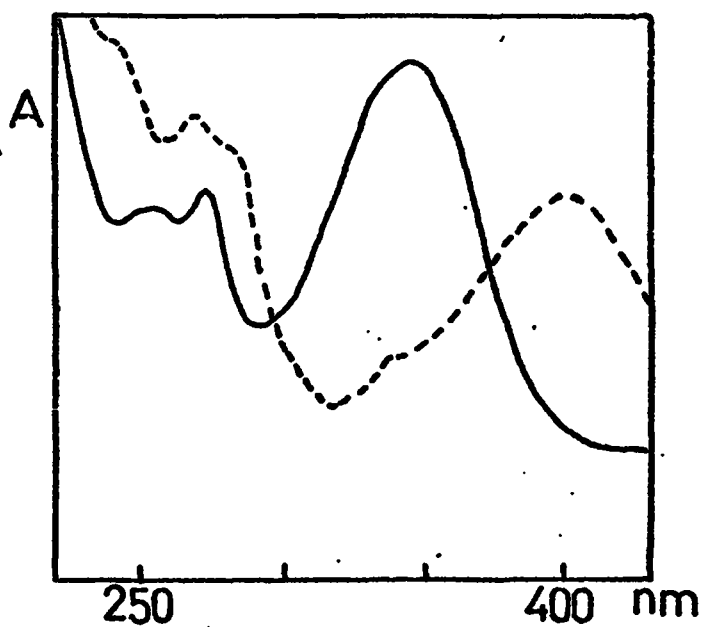
La fracción B1', se identifica también como el 6-C-glucosil Diosmetina.

La fracción B1" se identifica como el 8-C-glucosil Diosmetina, isómero del correspondiente derivado en 6 obtenido en la hidrólisis ácida.

# 6-C-GLUCOSIL DIOSMETINA



MeOH \_\_\_\_\_  
 " + NaOMe -----



## FRACCION B2

### Reacciones de color.:

Sustancia con carácter de flavona.

### Estudio espectrofotométrico en U.V. :

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	334, 309 <sup>a</sup> , 273
NaOMe	398, 329 , 283
AlCl <sub>3</sub>	380 <sup>a</sup> , 358 , 300, 278
AlCl <sub>3</sub> /HCl	380 <sup>a</sup> , 356 , 315 <sup>a</sup> , 281
NaOAc	394, 335 <sup>a</sup> , 315 <sup>a</sup> , 281
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	340, 323 <sup>a</sup> , 273
Amoníaco	382, 305 <sup>a</sup> , 282

### En medio neutro

- OH libre en posición 5 : Positivo (R-5 = 273 nm).
- Sustituyentes conjuntos en 3'y 4': Negativo (CRF < 83)
- Sustituyentes en 6 y/ú 8: Muy probable (R-5=273 nm).
- C-glicósido en 6 y/ú 8: Muy probable. (Inflexión a 309<sup>a</sup>)
- Esqueleto estructural básico de la Apigenina. (Máximo en la banda A , a 334 nm).
- Esqueleto estructural mas probable: De un C-glicósido en 6 y/ú 8 derivado de la Apigenina:

Con reactivos alcalinos:

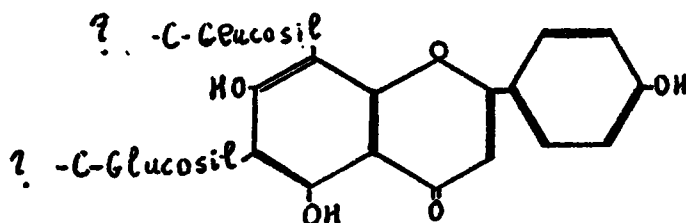
-Hidroxilo libre en posición 4' : Positivo.

-Hidroxilo libre en posición 7 : Positivo.

Con  $AlCl_3$ ,  $AlCl_3/HCl$  y  $NaOAc/H_3BO_3$ :

-Agrupación O-hidroxílica libre entre 3' y 4' : Negativo.

Estructura más probable: De un C-glicósido de Apigenina.

Cromatografía sobre papel:

Whatman n°1.

Técnica monodimensional descendente .

Saturación 1-hora.

Valores de  $R_f$  hallados para la fracción B2 y los C-glucósidos en 6, 8 y di-C-glucósido en 6 y 8 de la Apigenina.

Eluyentes	B2	(1)	(2)	(3)
		6-C-g.	8-C-g.	6-8diC-g.
B.A.W 4.1.5	0,16	0,56	0,41	0,15
B.A.W 20.6.15	0,55	0,72	0,63	0,55
Ac.Acético 10 %	0,49	0,39	0,20	0,50
Ac.Acético 30 %	0,68	0,63	0,46	0,68
AE.F.W 10.2.3 (&)	0,16	0,51	0,43	0,15

(&).- Fase superior.

(1,2 y 3). Valores obtenidos por Gentili y Horowitz, 1968.

### Hidrólisis ácida

En el extracto de éter etílico no se encuentran flavonoides. En el de acetato de etilo se halla una sustancia de respuesta idéntica a las de la fracción B2.

### Separación cromatográfica del extracto de acetato de etilo.

Whatman 3 MM

Técnica monodimensional descendente

Saturación 3 horas

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona</u>
Ac.Acético 15%	0,56
T.B.A 3.1.1	0,32

### Estudio espectrofotométrico en U.Vt de la aglicona aislada

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	334 , 309 <sup>a</sup> , 273
NaOMe	398 , 329 , 283
AlCl <sub>3</sub>	380 <sup>a</sup> , 358 , 300 , 278
AlCl <sub>3</sub> /HCl	380 <sup>a</sup> , 356 , 315 <sup>a</sup> , 281
NaOAc	394, 335 <sup>a</sup> , 315 <sup>a</sup> , 281
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	340 , 323 <sup>a</sup> , 273
Amoniaco	382 , 305 <sup>a</sup> , 282



En medio neutro:

- OH libre en posición 5 : Positivo. ( $R_5 = 273 \text{ nm}$ ).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4': Negativo ( $CRF < 83$ ).
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : Muy probable ( $R_5 = 273 \text{ nm}$ ).
- C-glicósido en 6 y/ó 8 : Muy probable (Inflexión a  $309\text{m}\mu$ ).
- Esqueleto estructural más probable : De un C-glicósido en 6 y/ó 8 derivado de la Apigenina.

Con reactivos alcalinos:

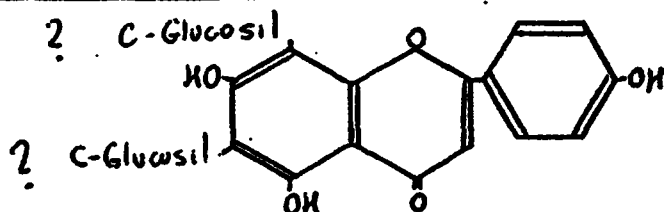
Hidroxilo libre en posición 4' : Positivo

Hidroxilo libre en posición 7 : Positivo

Con  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  y  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ :

-Agrupación dihidroxílica libre en 3' y 4': Negativo.

Estructura más probable: De un C-glicósido de la Apigenina.

Estudio cromatográfico de la aglicona:

Whatman nº1

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de  $R_f$  hallados, comparados con la fracción B2 y con el 6-8 diC-glucosilApigenina

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona</u>	<u>B2</u>	<u>6-8 diC-g.(1)</u>
B.A.W 4.1.5	0,15	0,16	0,15
<u>Ac.Acético 30 %</u>	0,68	0,68	0,68

(1) Harborne 1967.

Análisis de azúcares en la fracción acuosa del  
hidrolizado:

Resultado: negativo

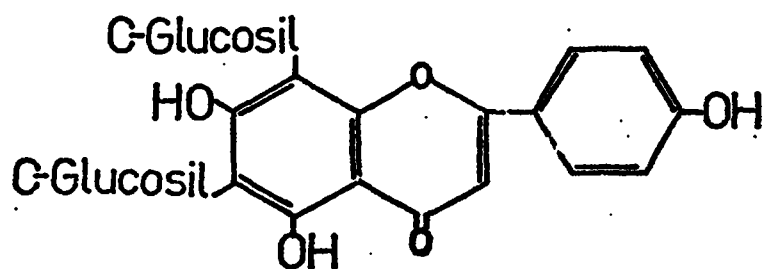
RESULTADO FINAL:

La fracción B2 no se hidroliza con los sistemas practicados a O-glicósidos. Ello prueba también su unión C-glicosídica. No se observan azúcares libres.

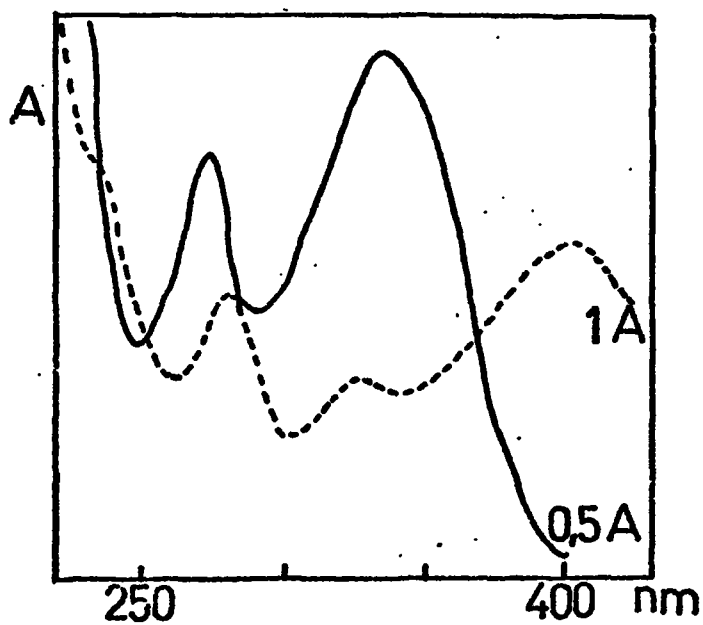
Las respuestas cromatográficas y espectrofotométricas coinciden con el 6-8 di-C-glucosil apigenina.



## 6,8 DI-C-GLUCOSIL APIGENINA



MeOH —————  
" + NaOMe - - - - -



FRACCION CReacciones de color:

Sustancia con carácter de flavona.

Estudio espectrofotométrico en U.V.:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	335 , 303 <sup>a</sup> , 272
NaOMe	398 , 329 , 282
NaOAc	382 , 304 <sup>a</sup> , 280
Amoníaco	380 , 305 <sup>a</sup> , 281
AlCl <sub>3</sub>	382 <sup>a</sup> , 352 , 304 , 275 , 236
AlCl <sub>3</sub> /HCl	382 <sup>a</sup> , 350 , 304, 275 , 235
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	342 , 310 <sup>a</sup> , 285 <sup>a</sup> , 272

En medio neutro.-

- OH libre en posición 5 : Positivo (R-5 = 272 nm).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4': Negativo (CRF < 83).
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : Posible ( R-5 = 273).
- C-glicósido en 6 y/ó 8 : Muy probable.
- Esqueleto estructural básico de la apigenina (Máximo en la banda A, 335 nm).
- Esqueleto estructural más probable: de un C-glicósido en 8 y derivado de Apigenina. (DEM = 63).

Con reactivos alcalinos:

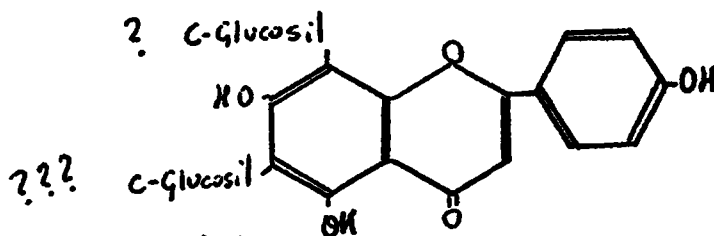
-Hidroxilo libre en posición 4': Positivo.

-Hidroxilo libre en posición 7 : Positivo.

Con  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  y  $\text{NaOMe}/\text{H}_3\text{BO}_3$ .-

-Agrupación dihidroxílica en 3'y 4': Negativo.

Estructura probable : De un C-glicósido de la Apigenina

Análisis cromatográfico:

Whatman nº1.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de  $R_f$  obtenidos para la Fracción C, frente a patrones de Xilosil-vitexina y Ramnosil-vitexina.

<u>Eluyentes</u>	<u>Fracción C</u>	<u>Xilosil vitexina</u>	<u>Ramnosil vitexina</u>
Ac. Acético 10 %	0,65	0,65	0,68
Ac.Acético 30 %	0,72	0,72	0,76
B.A.W 20.6.15	0,62	0,62	0,72
AE.F.W. 10.2.3 (&)	0,40	0,39	0,50.

Coincidiendo con los valores dados por Gentili y Horo-

Hidrólisis ácida:

Se extrae el hidrolizado con éter etílico y con acetato de etilo, no observándose flavonoides en el primer extracto y sí en el segundo.

Cromatografía preparativa del extracto de acetato de etilo:

Whatman 3 MM

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

Después del desarrollo se aprecian dos fracciones distintas con los siguientes valores de Rf:

<u>Eluyente</u>	<u>Fracción C-A</u>	<u>Fracción C-B</u>
Ac. Acético 15 %	0,30	0,55
T.B.A. 3.1.1.	0,43	0,57

Reacciones de color:

Ambas fracciones presentan respuestas de flavona.

Análisis de cada una de las nuevas fracciones obtenidas

FRACCION C-A

Análisis espectrofotométrico en U.V. :

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	336, 303 <sup>a</sup> , 270
NaOMe	395, 330 , 278
AlCl <sub>3</sub>	387, 351 , 305 , 277
AlCl <sub>3</sub> /HCl	382, 343 , 302 , 278
NaOAc	380, 301 , 280
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	345, 330 <sup>a</sup> , 271

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en 5 : Positivo (R-5 = 270).
- Sustituyentes conjuntos en 3'y 4': Negativo (CRF < 83).
- Sustituyentes en 6 y/ú 8 : Probable (R-5 = 270).
- C-glicósido en 6 y/ú 8: Muy probable.
- C-glicósido en 8 : Probable ( por inflex a 303<sup>a</sup>).

Esqueleto estructural básico de la apigenina. (Máximo en la banda A, 336 nm).

Esqueleto estructural más probable: el de un C-glicósido en 8 de la apigenina.

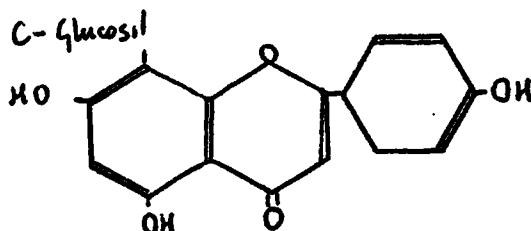
Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo libre en posición 7 : Positivo
- Hidroxilo libre en posición 4': Positivo.

Con  $\text{AlCl}_3$  ,  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{NaOAc/H}_3\text{BO}_3$  :

-Agrupación dihidroxílica en 3' y 4' : Negativo.

Estructura más probable: De un 8-C-glicósido de la apigenina.



Análisis cromatográfico de la Fracción C-A:

Whatman nº 1.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de los  $R_f$  hallados para la Fracción C-A,  
frente a Vitexina:

<u>Eluyentes</u>	<u>Fracción C-A</u>	<u>Vitexina</u>
Ac.Acético 10 %	0,21	0,21
Ac.Acético 30 %	0,47	0,47
B.A.W 4.1.5	0,40	0,41
B.A.W 20.6.15	0,64	0,63
AE.F.W. 10.2.3 (&)	0,44	0,44



FRACCION C-BEstudio espectrofotométrico en U.V.:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	336, 271
NaOMe	400, 329, 278
AlCl <sub>3</sub>	382, 350, 305, 278, 262 <sup>a</sup>
AlCl <sub>3</sub> /HCl	380, 342, 303, 280, 260 <sup>a</sup>
NaOAc	385, 303, 279
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	408 <sup>a</sup> , 346, 274

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en posición 5 : Positivo. (R-5 = 271 nm).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4':: Negativo (CRF<83).
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : Posible (R-5 = 271 nm).
- C-glicósido en 6 y/ó 8 : Muy probable.
- C-glicósido en 6 : Probable (Carece de inflexión a 290<sup>a</sup> nm)
- Esqueleto estructural básico de la Apigenina. (Máximo en la banda A, 336 nm).
- Esqueleto estructural más probable : el de C-glicó-  
sido en 6, derivado de Apigenina.

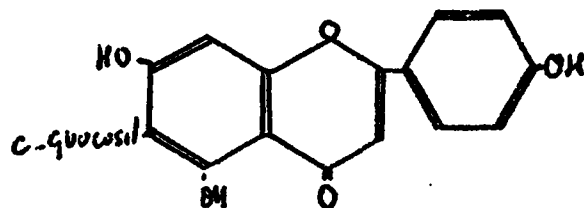
Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo libre en posición 4' : Positivo.
- Hidroxilo libre en posición 7 : Positivo.

Con AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl y NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>:

- Agrupación dihidroxílica en 3' y 4' : Negativo.

Estructura más probable : 6-C-glicósido de la apigenina.



Análisis cromatográfico de la Fracción C-B.

Papel Whatman nº 1

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para la Fracción C-B frente a Isovitexina.

<u>Eluyentes</u>	<u>Fracción C-B</u>	<u>Isovitexina</u>
B.A.W. 20.6.15	0,71	0,72
B.A.W. 4.1.5	0,56	0,56
Ac.Acético 10 %	0,40	0,39
Ac.Acético 30 %	0,64	0,64
AE.F.W. 10.2.3 (&)	0,50	0,51
(&)- Fase superior		

Análisis de azúcares en la fracción acuosa del hidrolizado:

Por cromatografía y frente a patrones de xilosa, ramnosa y glucosa.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados en el análisis de azúcares.

<u>Soporte</u>	<u>Eluyente</u>	<u>Azúcar Prob.</u>	<u>Xilosa</u>	<u>Ramnosa</u>	<u>Glucosa</u>
Papel	1	0,42	0,42	0,65	0,20
Gel sílice					
F 254	2	0,26	0,26	0,52	0,28
"	3	0,43	0,43	0,63	0,47

Eluyente 1 = Acetato de etilo . Isopropanol .Agua.  
(65. 23,4 . 11,7 ).

Eluyente 2 = Cloroformo. Metanol. Agua. (64.36.8).

Eluyente 3 = Acetato de etilo. Metanol. Ac.acético.  
Agua. ( 60.15.15.10).

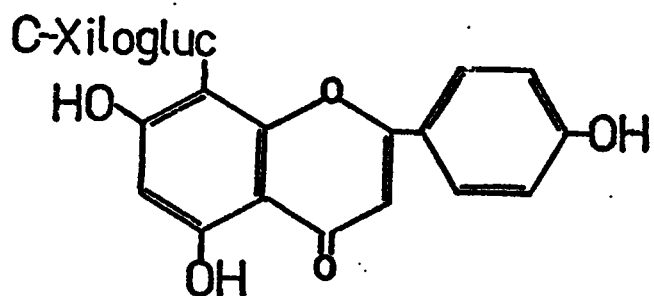
Al revelar con timol la muestra problema adquiere un color violeta rojizo, que al cabo de una hora ha pasado a azul, así como en la xilosa.

#### RESULTADO FINAL.-

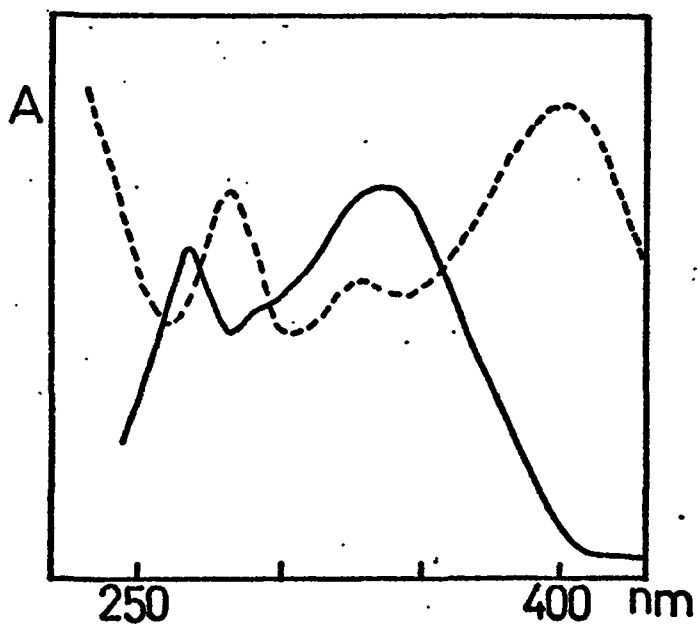
Se identifica la fracción C como la  
Xilosil vitexina.

La C-A como Vitexina y la C-B como  
Isovitexina.

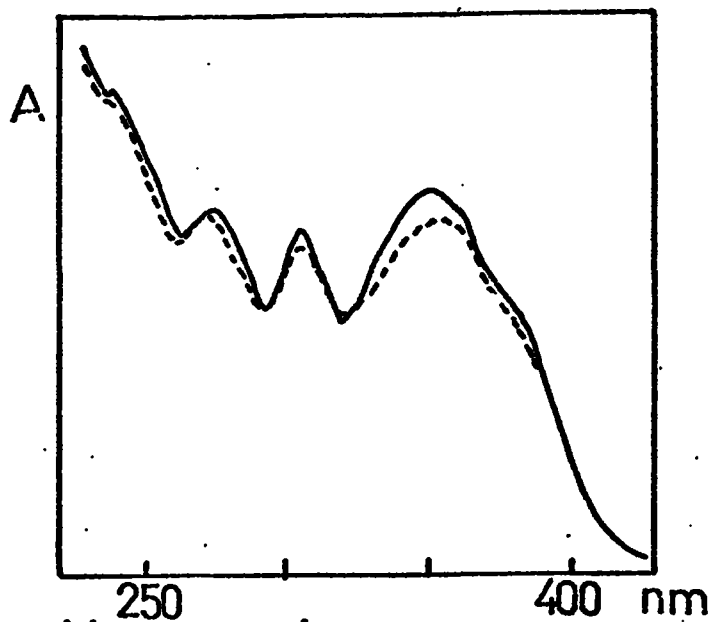
## XILOXIL VITEXINA



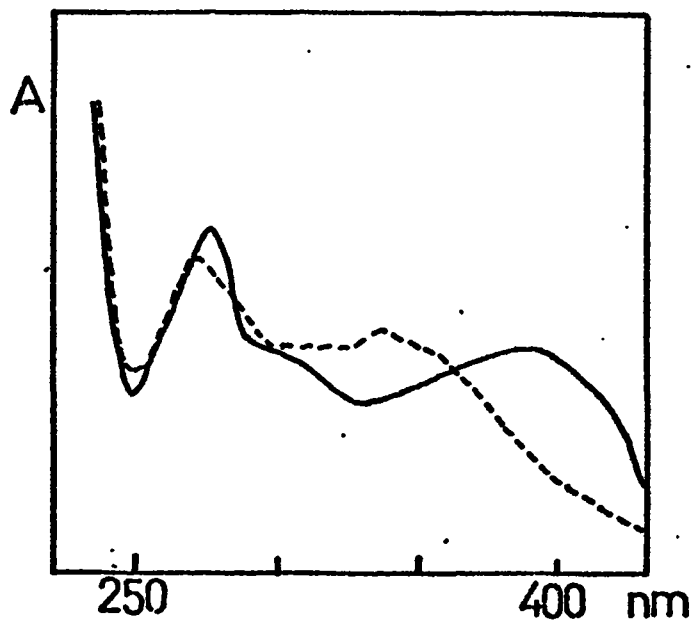
MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -



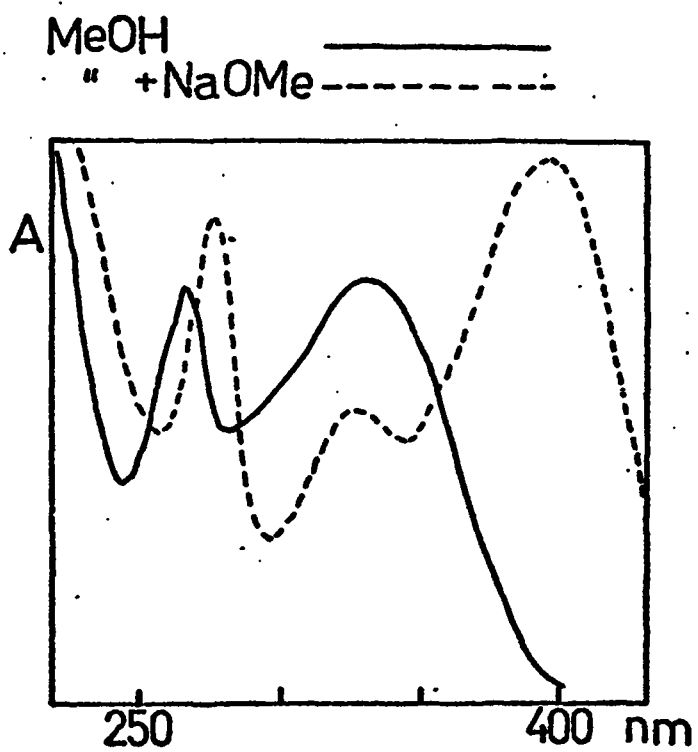
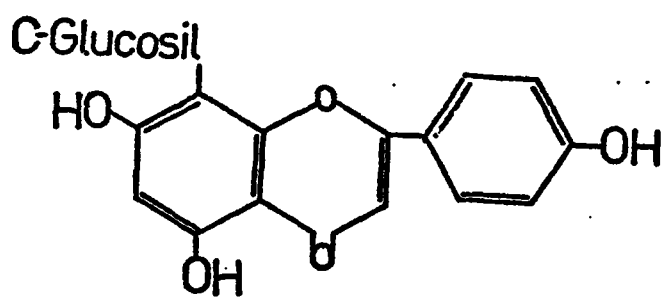
MeOH+AlCl<sub>3</sub> \_\_\_\_\_  
" +AlCl<sub>3</sub>/HCl -----

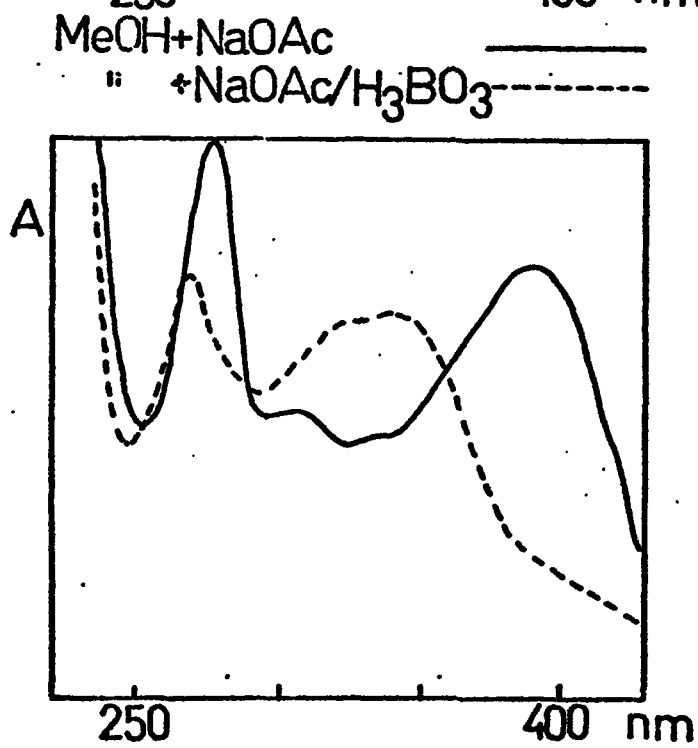
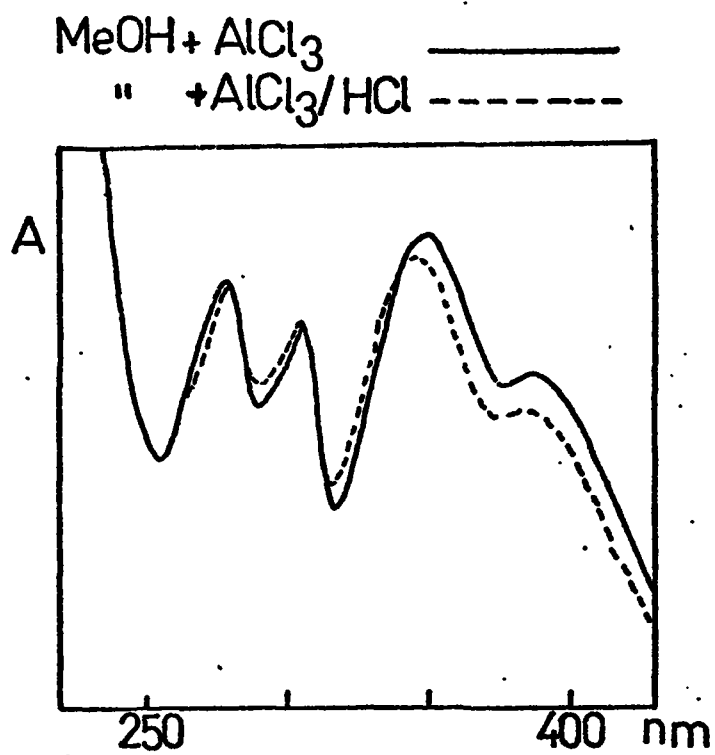


MeOH+NaOAc \_\_\_\_\_  
" +NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> -----

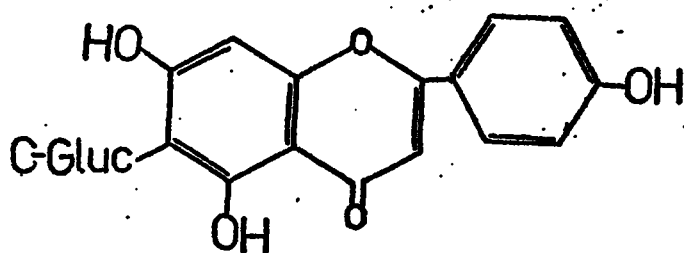


## VITEXINA

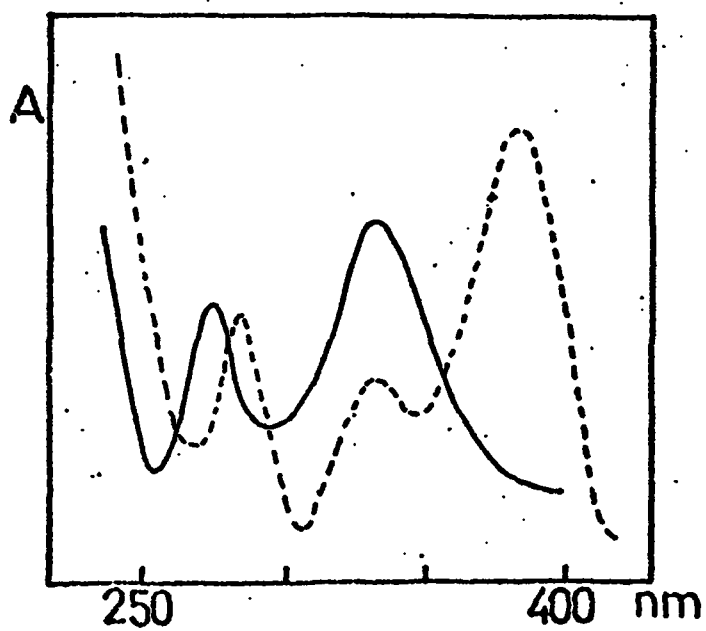




## ISOVITEXINA



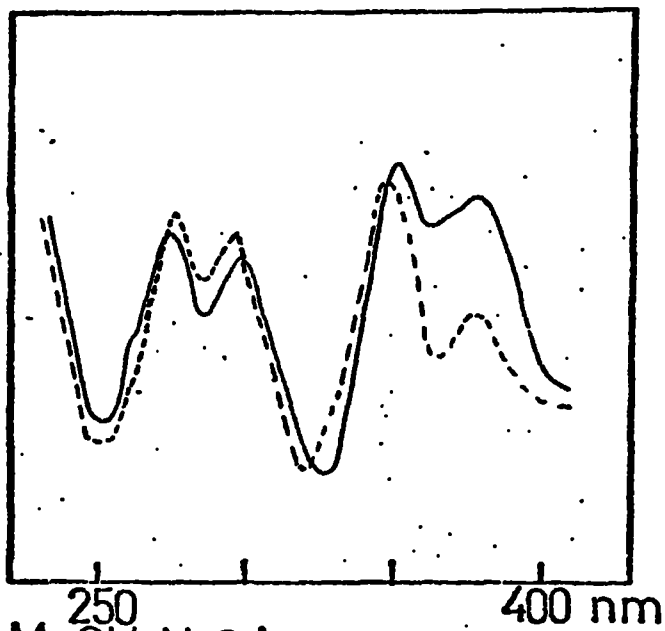
MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -





MeOH + AlCl<sub>3</sub> \_\_\_\_\_  
 " + AlCl<sub>3</sub>/HCl -----

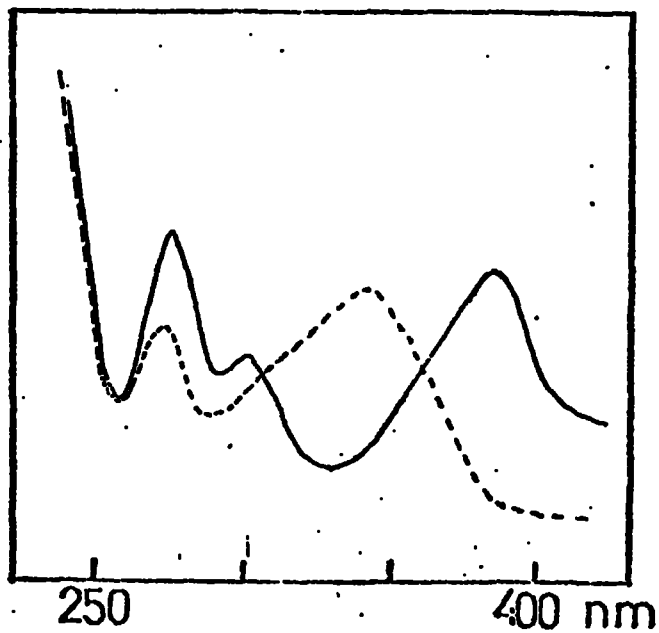
A



250 MeOH + NaOAc \_\_\_\_\_

" + NaOAc H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> -----

A



FRACCION DReacciones de color:

Presenta característica de flavanona.

Estudio espectrofotométrico en U.V.

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	326, 285
NaOMe	356, 286, 242
AlCl <sub>3</sub>	383, 309
AlCl <sub>3</sub> /HCl	378, 307
NaOAc	329, 283
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	327, 283

En medio neutro:

-Hidroxilo en posición 5 : Positivo.

Con reactivos alcalinos:

-Hidroxilo en posición 7 : Negativo.

Con reactivos metálicos:

-Hidroxilo en posición 5 : Positivo.

Los valores de los R<sub>f</sub> hallados en cromatografía preparativa y los espectros analizados son similares a los de la Hesperidina.

Análisis cromatográfico.

Whatman nº 1, Gel de Sílice y Poliamida .

Técnica modimensional descendente para papel.

" " ascendente " placa.

Saturación 1 hora.

<u>Eluyentes</u>	<u>Soporte</u>	<u>Fracción D</u>	<u>Hesperidina</u>
Ac. Acético 10 %	What.	0,72	0,72
Ac. Acético 30 %	What.	0,85	0,85
B.A.W 4.1.5	What.	0,48	0,48
D.A.A 20.1.1	Gel	0,80	0,80
N.M.W 5.2.0,025	Pol.	0,60	0,60

D.A.A = Dioxano .Acetona . Acético.

N.M.W = Nitrometano. Metanol. Agua.

Hidrólisis ácida.

Como en las demás fracciones, se procede a la hidrólisis. En el extracto de eter etílico, se observa una aglicona, a la que pasamos a identificar.

Cromatografía preparativa de la aglicona:

Whatman 3 MM

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona</u>
Ac.Acético 30 %	0,68
B.A.W 4.1.5	0,90

Estudio espectrofotométrico de la aglicona aislada.

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	326 <sup>a</sup> , 289
NaOMe	323 , 246
AlCl <sub>3</sub>	376 , 310
AlCl <sub>3</sub> /HCl	372 ., 309
NaOAc	323 , 290 <sup>a</sup>
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	333 <sup>a</sup> , 289

En medio neutro:

-Hidroxilo en posición 5 : Positivo.

Con reactivos alcalinos :

-Hidroxilo en posición 7 : Positivo.

Con reactivos metálicos:

-Hidroxilo en posición 5 : Positivo.

Análisis cromatográfico de la aglicona.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para la aglicona frente a la hesperetina, en distintos soportes y eluyentes:

<u>Eluyentes</u>	<u>Soportes</u>	<u>Aglicona</u>	<u>Hesperetina</u>
Ac.Acético 30%	What.	0,68	0,68
B.A.W 4.1.5	"	0,90	0,90
N.M 5.2	Pol.	0,58	0,58

---

N.M = Nitrometano. Metanol.

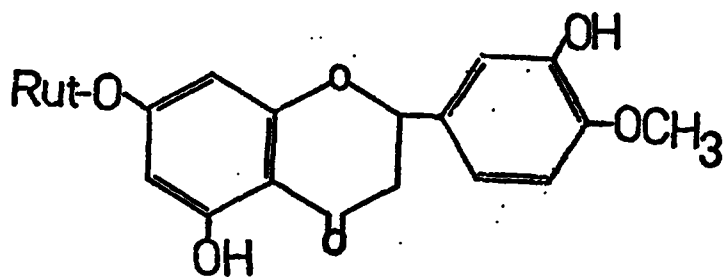
Análisis de azúcares en la fracción acuosa del  
hidrolizado:

Resultado :      Glucosa: Positivo.  
                     Ramnosa: Positivo.

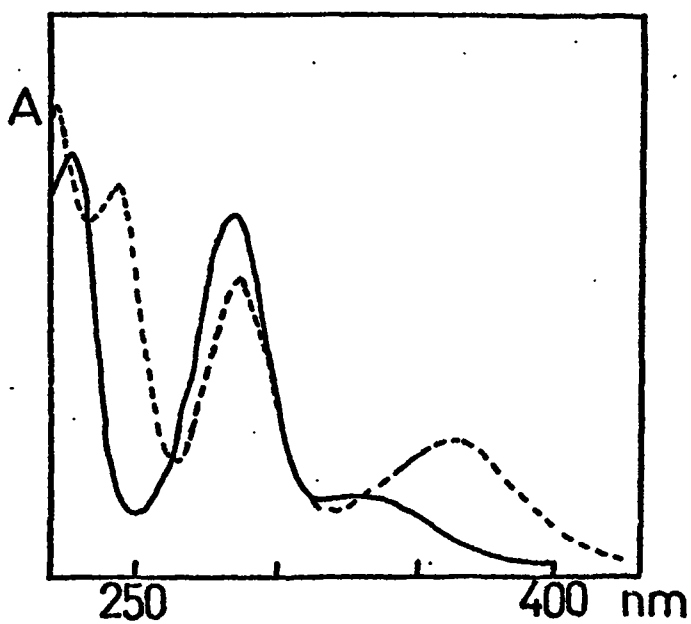
RESULTADO FINAL.

Queda identificada la fracción D  
como el 7-ramnoglucósido de la Hesperetina, llamada  
también Hesperidina.

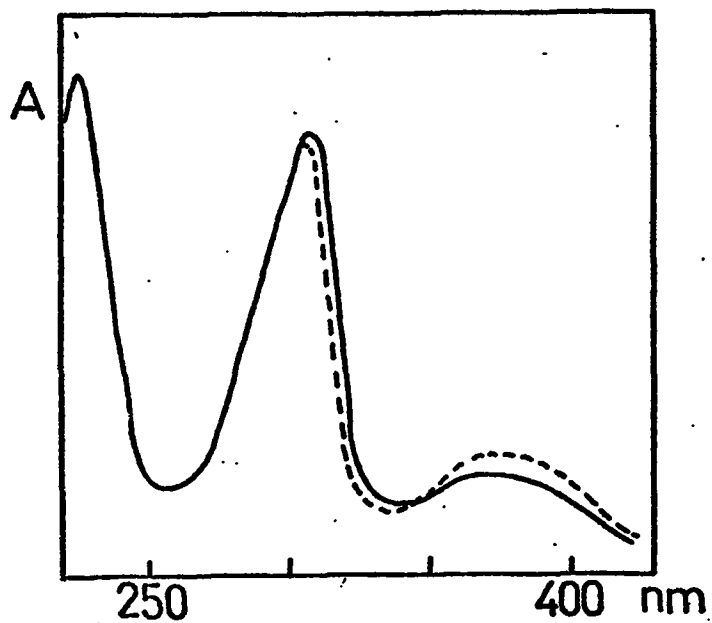
## HESPERIDINA



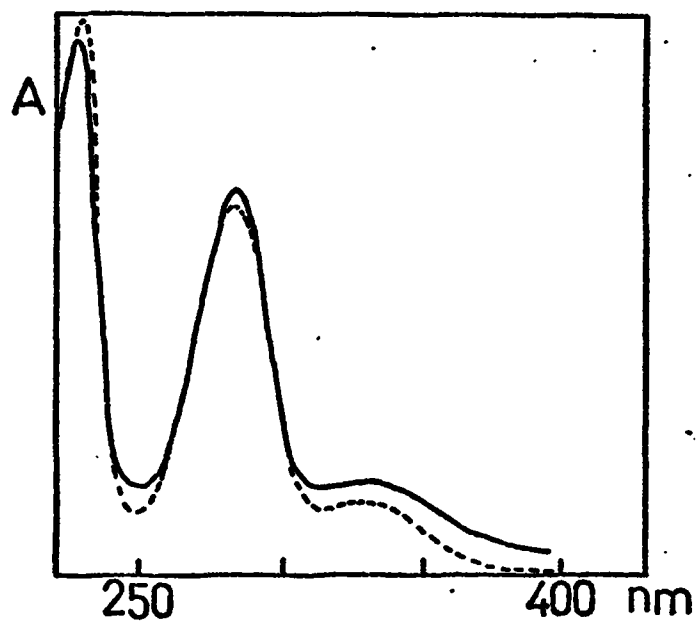
MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -



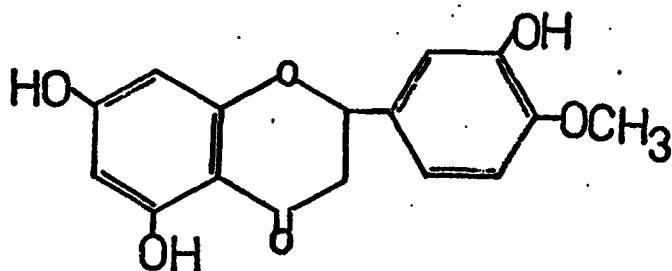
MeOH +  $\text{AlCl}_3$  —————  
" +  $\text{AlCl}_3$  HCl - - - - -



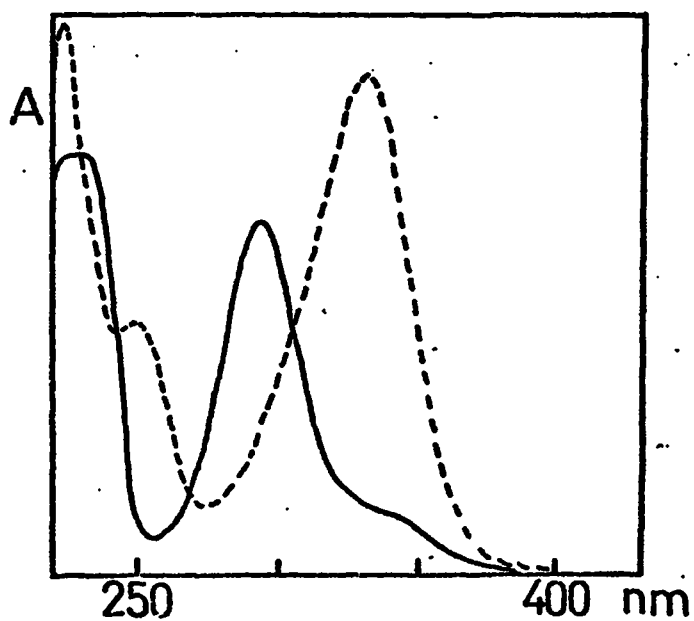
MeOH + NaOAc —————  
" + NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  - - - - -



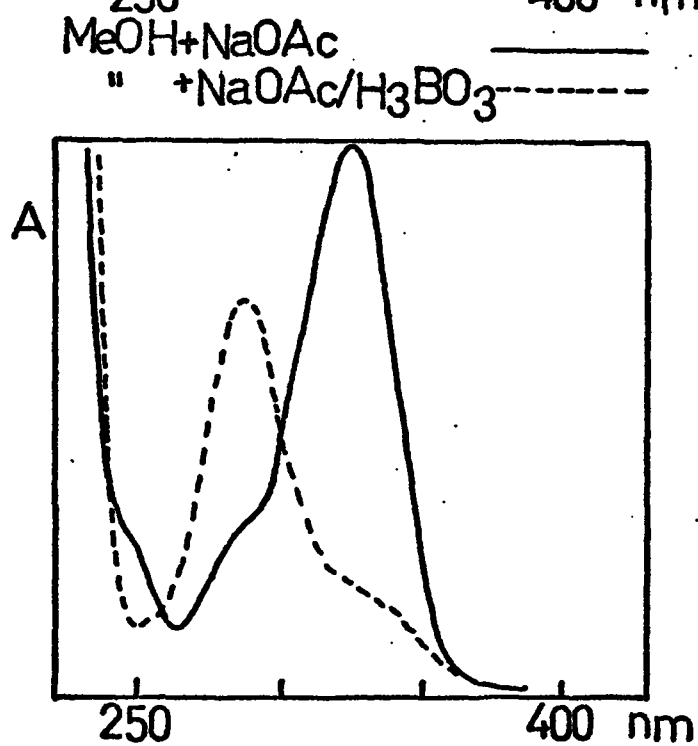
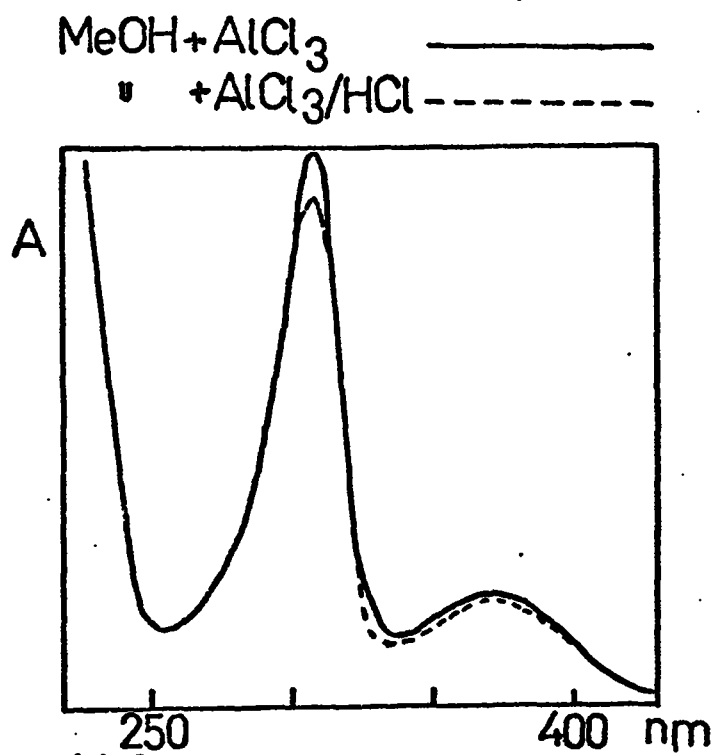
# HESPERETINA



MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe -----







## 2º.- FRACCIONES 46-60

=====

El conjunto de fracciones se concentra y se somete a cromatografía preparativa con distintos eluyentes, obteniendo los siguientes resultados.

### Cromatografía preparativa de las fracciones 46-60.-

Whatman 3 MM.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

Valores de los Rf hallados en las cromatografías: Se se- para una sólo banda significativa.

<u>Eluyentes</u>	<u>Rf</u>
Ac.Acético 15 %	0,36
T. B. A	0,42

### Reacciones de color.

Presenta típica respuesta de flavonas.

### Estudio espectrofotométrico:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	346,,290 <sup>a</sup> , 267 , 253
NaOMe	382 <sup>(o)</sup> ,290 <sup>a</sup> , 268
AlCl <sub>3</sub>	395 <sup>a</sup> ,355 , 290 , 267 , 240 <sup>a</sup>

.../...

(o).- Con decrecimiento en intensidad.

$\text{AlCl}_3/\text{HCl}$	395 <sup>a</sup> , 350 , 290 , 268 , 240 <sup>a</sup>
$\text{NaOAc}$	370 , 318 , 268
$\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$	345 , 275 <sup>a</sup> , 269

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en 5 : Positivo. (  $R-5 = 267 \text{ nm}$  ).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4': Positivo ( $\text{CRF} > 83$ ).
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : Poco probable.
- C-glicósido en 6 y/ó 8 . Poco probable.
- Esqueleto estructural básico: Derivado de la Luteolina.

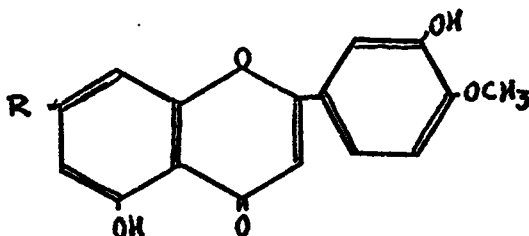
Con reactivos alcalinos:-

- Hidroxilo libre en posición 4': Negativo.
- Hidroxilo libre en posición 7 : Negativo.

Con  $\text{AlCl}_3$  ,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  y  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ :

- Agrupación O-hidroxílica en 3' y 4' : Negativo.

Estructura probable: Derivado de la diosmetina.



Análisis cromatográfico del producto aislado.

Papel Whatman nº 1.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para el producto aislado

<u>Eluyentes</u>	<u>Problema</u>
Ac.Acético 10 %	0,20
B.A.W 4.1.5	0,55
Isopropanol..Agua 6.4	0,68

Hidrólisis ácida.

En el extracto de éter etílico se reconoce la presencia de una aglicona. En el de acetato de etilo no se observan respuestas de flavonoides.

Cromatografía preparativa de la aglicona.--

Whatman 3 MM.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para purificar la aglicona.

<u>Eluyente</u>	<u>Aglicona</u>
Ac. Acético 30 %	0,24
T.B.A	0,80

Estudio espectrofotométrico de la aglicona aislada.

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	344, 290 <sup>a</sup> , 267 , 251 , 240 <sup>a</sup>
NaOMe	385, 303 <sup>a</sup> , 270
AlCl <sub>3</sub>	392, 362 , 295 , 272 , 268 <sup>a</sup>
AlCl <sub>3</sub> /HCl	385, 350 , 295 , 275 , 265 <sup>a</sup>
NaOAc	368, 322 , 274
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	348, 268 , 253 <sup>a</sup>

En medio neutro:

- Hidroxilo en posición 5 : Positivo. (R-5 = 267 nm).
- Sustituyentes en posiciones 3' y 4': Positivo.  
(CRF > 83 ).
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : Poco probable.
- C-glicósido en 6 y/ó 8 : Poco probable.
- Esqueleto estructural básico: Derivado de la Luteolina.

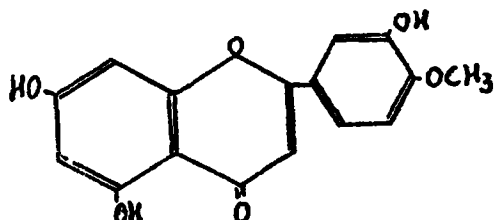
Con reactivos alcalinos:-

- Hidroxilo libre en posición 4' : Negativo .
- Hidroxilo libre en posición 7 . Positivo.

Con AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl y NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>:

- Agrupación -dihidroxílica libre en 3' y 4': Negativo.

Estructura probable: Diosmetina.



Análisis cromatográfico de la aglicona.

Whatman nº 1 (&) y Gel de sílice F254 (&&).

Técnica monodimensional descendente (&) y ascendente(&&).

Saturación 1 hora.

Valores de los Rf hallados para la aglicona frente a patrón de Diosmetina.

<u>Soporte</u>	<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona</u>	<u>Diosmetina</u>
&	Ac.Acético 10 %	0,02	0,02
&	Ac.Acético 30. %	0,24	0,24
&	B.A.W 20.6.15	0,92	0,90
&	AE.F.W 10.2.3 (fase sup.)	0,86	0,87
&&	B.D.A 90.25.4	0,46	0,46

B.D.A = Benceno. Dioxano .Acético.

Tanto por las constantes espectrofotométricas como por las cromatográficas, la aglicona problema se identifica como Diosmetina.

Análisis de azúcares en la fracción acuosa del hidrolizado:

Resultados:            Glucosa - Positivo.  
                              Ramnosa - Positivo.

Análisis cromatográfico:

Whatman nº 1.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de los Rf hallados.

<u>Eluyentes</u>	<u>Problema</u>	<u>Diosmina</u>
B.A.W 4.1.5	0,54	0,54 (1)
Isopropanol.Agua 6.4	0,68	0,68 (1)
Ac.Acético 10 %	0,20	0,20 (2)
B.A.W 20.6.15	0,60	0,60 (2)

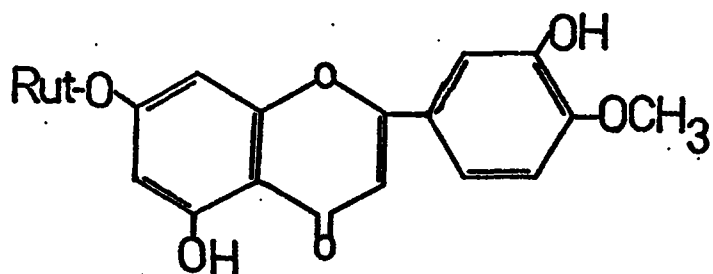
(1). Block y col. ,1958.

(2). Horowitz , 1956.

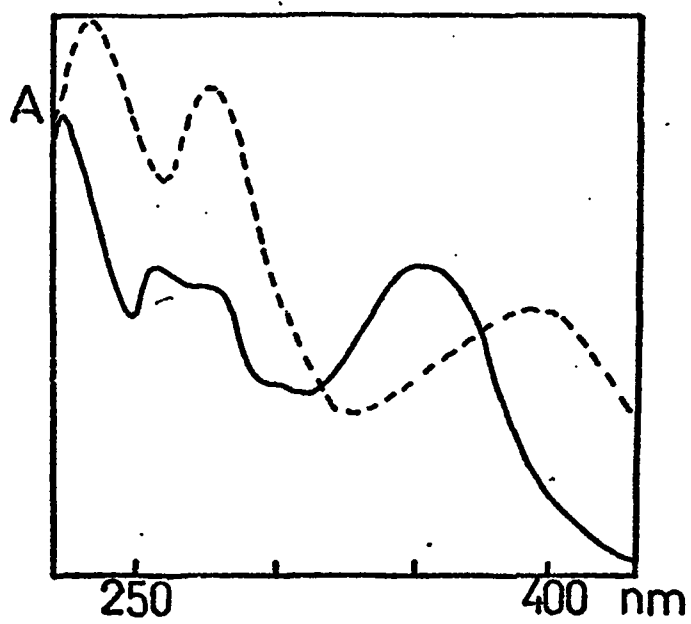
RESULTADO FINAL.

Se identifica el compuesto analizado  
 como el 7-Ramnoglucósido de la diosmetina.

## DIOSMINA

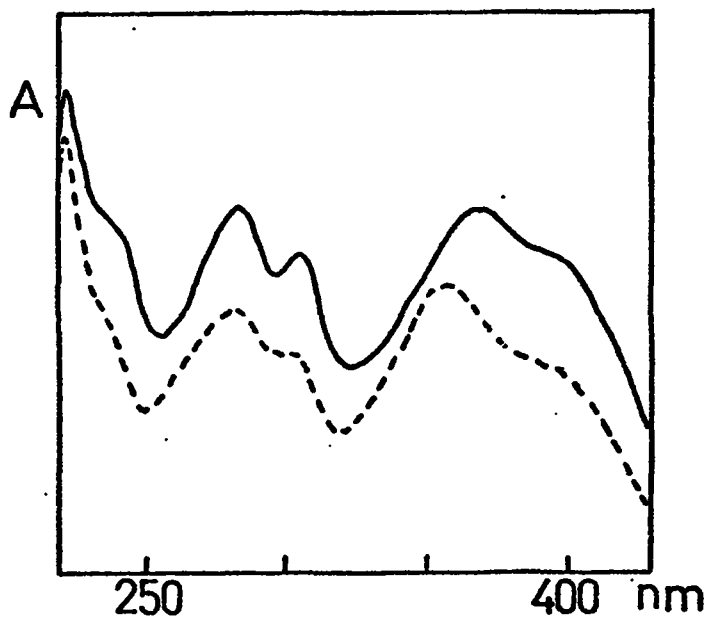


MeOH —————  
" + NaOMe - - - - -

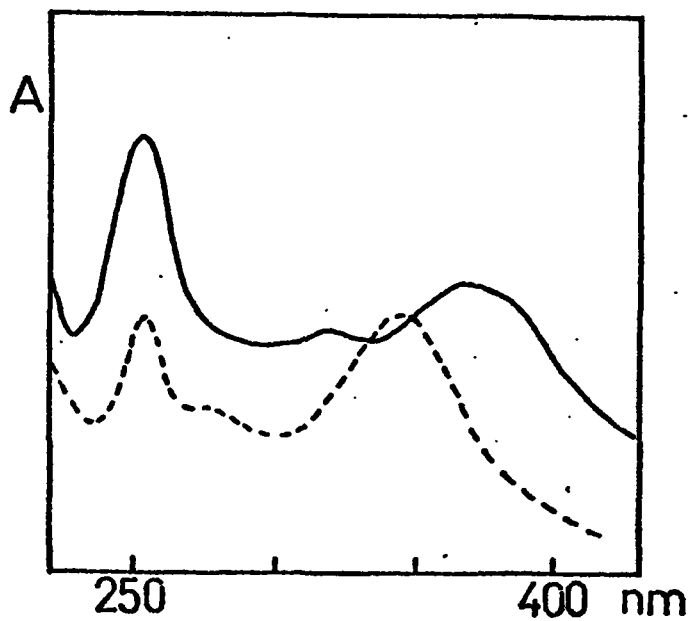




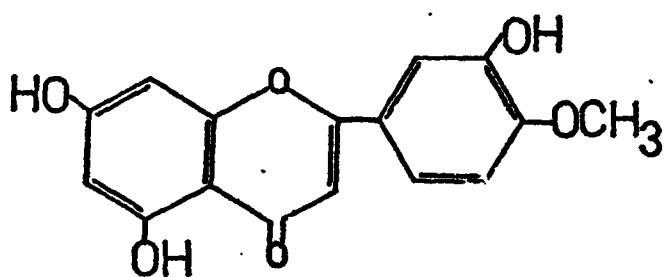
MeOH +  $\text{AlCl}_3$  \_\_\_\_\_  
" +  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  - - - - -



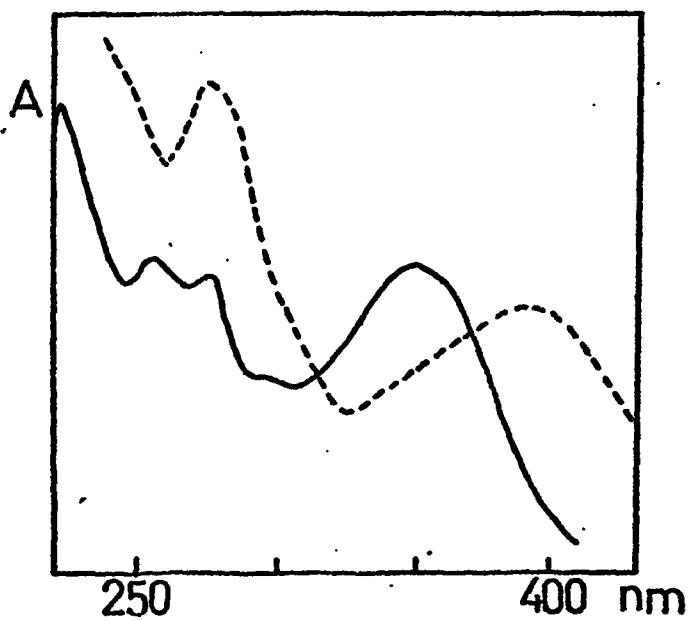
MeOH +  $\text{NaOAc}$  \_\_\_\_\_  
" +  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$  - - - - -

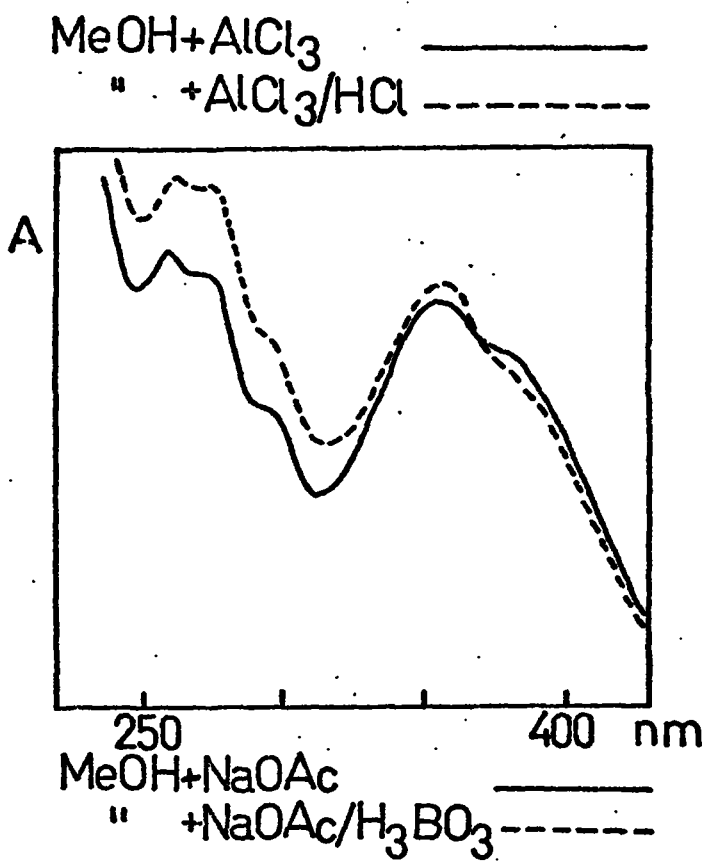


## DIOSMETINA



MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -





### 3º.- FRACCIONES 61 - 75

=====

Se sigue el proceso idéntico al efectuado en las fracciones anteriores.

#### Cromatografías preparativa.

Whatman 3 MM

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para las distintas fracciones aisladas.

<u>Eluyente</u>	<u>Fracción A</u>	<u>Fracción B</u>
Ac.Acético 15 %	0,23	0,30
T.B.A	0,60	0,26

#### Reacciones de color ;

Ambas sustancias muestran respuestas cromogénicas típicas de flavonas.

#### FRACCION A

#### Estudio espectrofotométrico en U.V.:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	333, 268
NaOMe	385, 300 <sup>a</sup> , 269 , 245 <sup>a</sup> .../..

Cont.

AlCl <sub>3</sub>	386 , 348 , 300 , 275
AlCl <sub>3</sub> /HCl	382 , 341 , 300 , 276
NaOAc	387 , 355 , 267 , 257 <sup>a</sup>
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	340 , 267

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en posición 5 : Positivo.(R-5 = 267).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4' : Negativo .  
(CRF < 83)
- Sustituyentes en 6 y/ó 8 : Poco probable.
- C-glicósido en 6 y/ó 8 : Poco probable.
- Esqueleto estructural básico: Derivado de la Apigenina ( Máximo banda A , 333 nm).

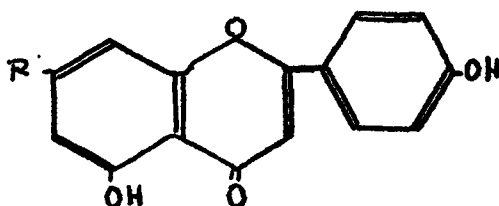
Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo libre en posición 4' : Positivo.
- Hidroxilo libre en posición 7 : Negativo .

Con AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl y NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> :

- Agrupación O-dihidroxílica : Negativo.

Estructura probable: Derivado de la apigenina.



### Análisis cromatográfico.

Se cromatografía la fracción A (posible derivado de Apigenina), frente a los derivados 7-Glucósido y 7-Ramnoglucósido.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para los tres compuestos:

<u>Eluyentes</u>	<u>Fracción A</u>	<u>7-Gluc.(1)</u>	<u>7-Ramnogluc.(1)</u>
B.A.W 4.1.5	0,65	0,65	0,58
Ac, Acético 15%	0,24	0,25	0,46
Ac. Acético 30%	0,42	0,42	0,64

(1) Harborne, 1967.

### Hidrólisis ácida.

Se realiza como en los anteriores compuestos. En el éter etílico se extrae una aglicona con característica de flavona.

### Cromatografía preparativa de la aglicona de la fracción A:

Whatman 3 MM.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona Fracción A</u>
Ac. Acético 30 %	0,30
B.A. W 4.1.5	0,90

Estudio espectrofotométrico en U.V. de la aglicona:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	336, 295 <sup>a</sup> , 267
NaOMe	390, 323 , 275
AlCl <sub>3</sub>	384, 350 , 300, 276
AlCl <sub>3</sub> /HCl	381, 340 , 298, 276
NaOAc	375, 300 , 274
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	338, 300 <sup>a</sup> , 268

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en posición 5 : Positivo (R-5 = 267 nm).
- Sustituyentes en posiciones 3'y 4': Negativo (CRF<83).
- Sustituyentes en 6 y/ú 8 : Poco probable.
- C-glicósido en 6 y/ú 8 : Poco probable.
- Esqueleto estructural básico : Derivado de la apigenina.

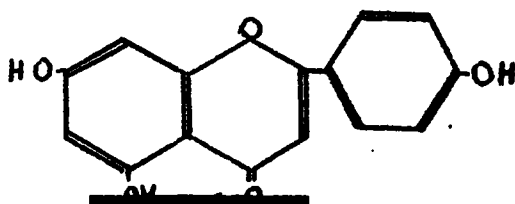
Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo libre en posición 4' : Positivo.
- Hidroxilo libre en posición 7 : Positivo.

Con AlCl<sub>3</sub> , AlCl<sub>3</sub>/HCl y NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>:

- Agrupación dihidroxílica libre en 3'y 4': Negativo

Estructura probable: Apigenina.



Análisis cromatográfico de la aglicona:

Whatman nº 1 (&) y Gel de sílice F 254 (&&).

Técnica monodimensional descendente (&) y ascendente (&&).

Saturación 60 minutos (&) y 30 minutos (&&).

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para la aglicona y el patrón de Apigenina.

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona</u>	<u>Apigenina</u>
Ac.Acético 10 % (&)	0,03	0,03
Ac.Acético 30 % (&)	0,28	0,28
Ac.Acético 50 % (&)	0,57	0,58
B.A.W 4.1.5 (&)	0,90	0,90
B.D.A 90.25.4 (&&)	0,40	0,40

B.D.A. = Benceno. Dioxano. Ac.Acético.

Análisis de azúcares en la fracción acuosa del hidrolizado:

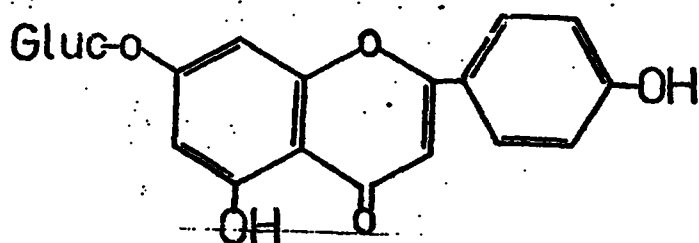
Sólo se observa Glucosa.

Resultado final:

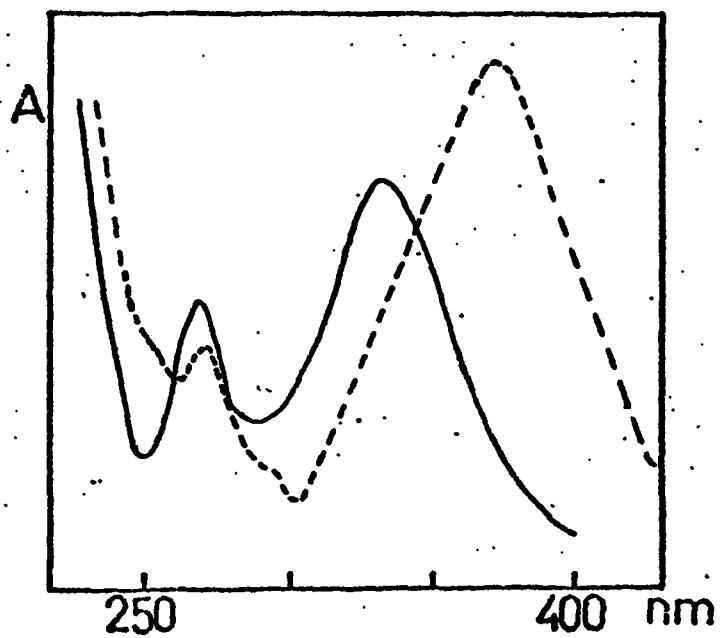
Se identifica éste compuesto como el 7-Glucósido de apigenina.



## APIGENINA 7-GLUCOSIDO

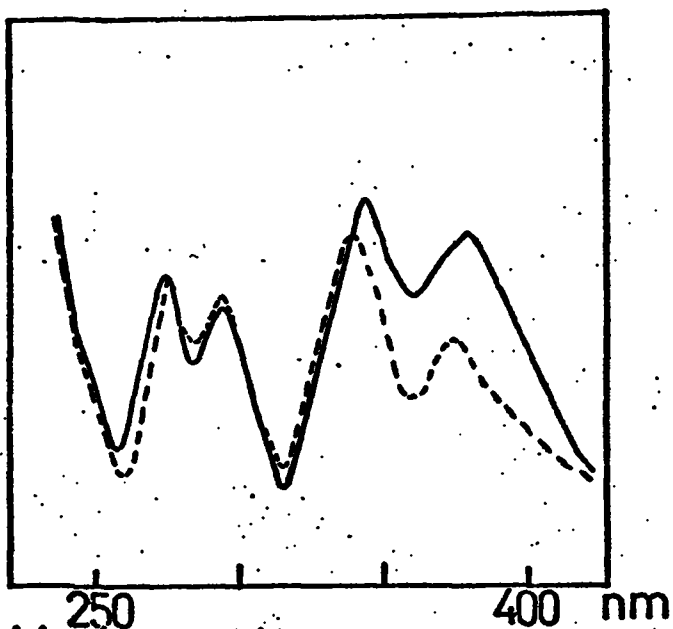


MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -



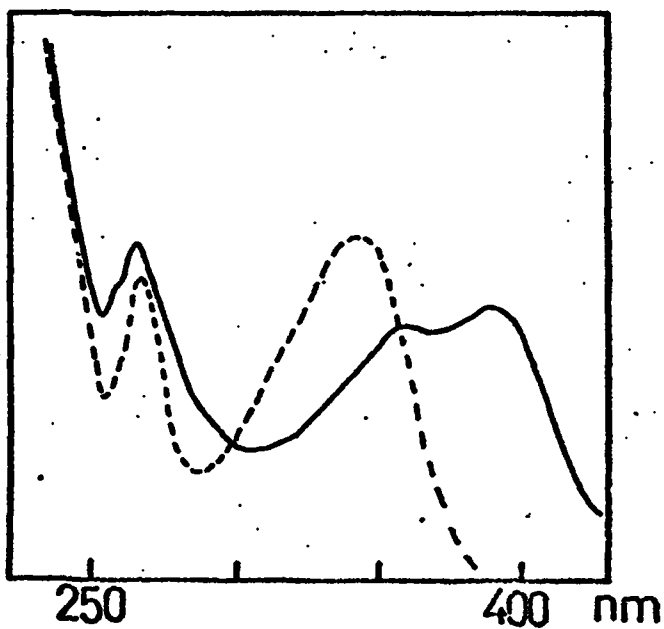
MeOH+AlCl<sub>3</sub> \_\_\_\_\_  
" +AlCl<sub>3</sub>/HCl -----

A

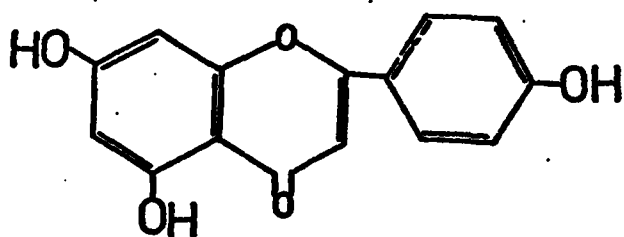


MeOH+NaOAc \_\_\_\_\_  
" +NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> -----

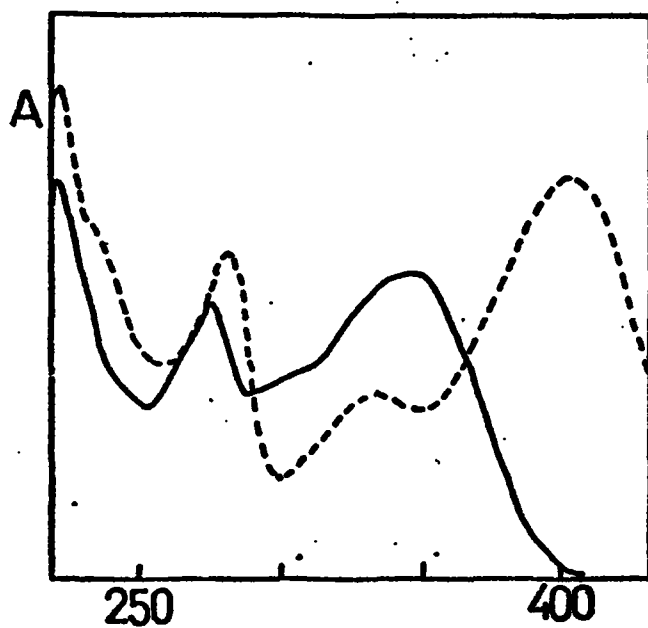
A



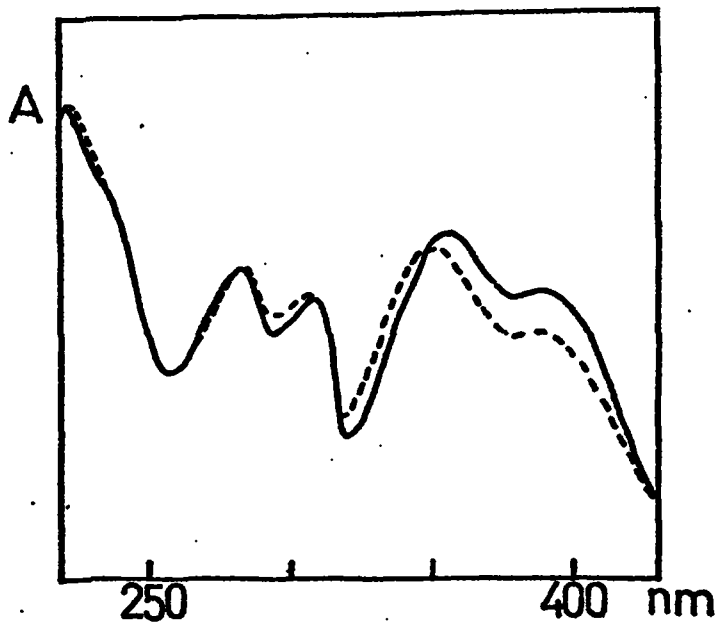
## APIGENINA



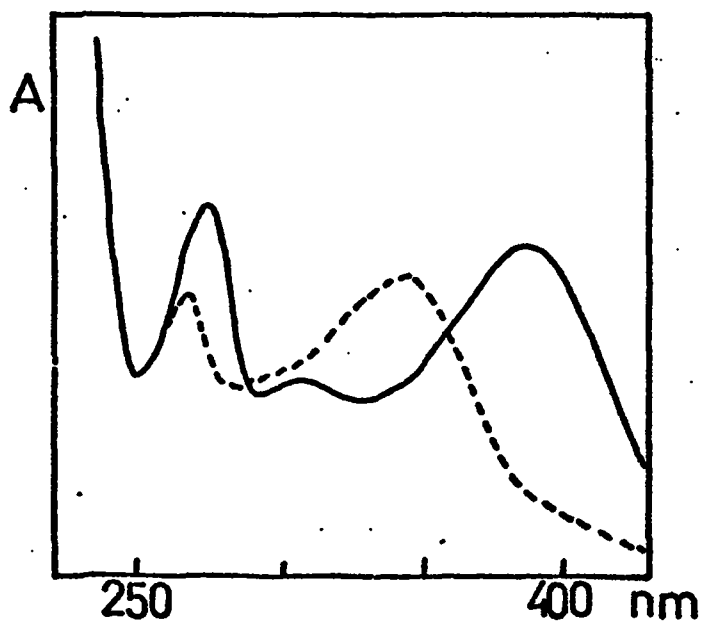
MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -



MeOH +  $\text{AlCl}_3$  \_\_\_\_\_  
" +  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  -----



MeOH + NaOAc \_\_\_\_\_  
+ NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  -----



FRACCION BEstudio espectrofotométrico en U.V.

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	348, 267 <sup>a</sup> , 254
NaOMe	394, 300 <sup>a</sup> , 262
AlCl <sub>3</sub>	430, 330 , 296 <sup>a</sup> , 272
AlCl <sub>3</sub> /HCl	390, 360 , 295 <sup>a</sup> , 272
NaOAc	402, 366 , 267 <sup>a</sup> , 259
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	370, 266 <sup>a</sup> , 258

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en posición 5 : Positivo (R-5 = 267<sup>a</sup>),
- Sustituyentes conjuntos en posiciones 3'y 4': Positivo. ( CRF > 83).
- Sustituyentes en 6 y /ú 8 : Negativo.
- C-glicósido en 6 y /ú 8 : Negativo.
- Esqueleto estructural básico: Derivado de la Luteolina.  
(Máximo en Banda A , 348 nm).

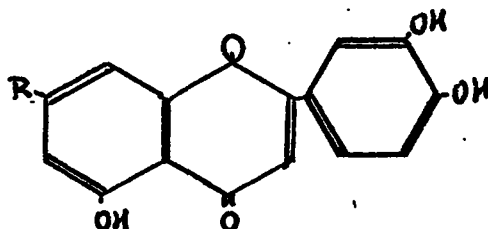
Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo libre en posición 4' : Positivo.
- Hidroxilo libre en posición 7 : Negativo.

Con AlCl<sub>3</sub> , AlCl<sub>3</sub>/HCl y NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>:

- Agrupación O-dihidroxílica en 3'y 4' : Positivo.

Estructura probable: Derivado de la luteolina.



Análisis cromatográfico.-

Whatman nº 1.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

Valores de los R<sub>f</sub> hallados para la Fracción B, frente al 7-Ramnoglucósido de la Luteolina; que por las anteriores respuestas cromatográficas y espectrofotométricas parece tratarse:

<u>Eluyentes</u>	<u>Fracción B</u>	<u>7-R.G.Luteol.</u>
B.A.W 4.1.5	0,48	0,48
Ac.Acético 60 %	0,70	0,71

Hidrólisis ácida:

Con el extracto etéreo del hidrolizado se obtiene una aglicona. En el extracto de acetato de etilo no se aprecia respuesta de flavonoides.

Cromatografía preparativa de la aglicona:

Whatman 3 MM

Técnica monodimensional descendente

Saturación 3 horas.

Valores de los Rf hallados para la aglicona de la fracción B y del patrón Luteolina.

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona</u>	<u>Luteolina</u>
Ac.Acético 15%	0,08	0,08
Ac.Acético 50%	0,47	0,47
T.B.A 3.1.1	0,77	0,78
B.A.W 4.1.5	0,70	0,71

Estudio espectrofotométrico en U.V. de la aglicona:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	349, 290 $\pm$ , 267 , 253 , 242 $\pm$
NaOMe	400, 330 $\pm$ , 266
AlCl <sub>3</sub>	425, 328 , 300 $\pm$ , 274
AlCl <sub>3</sub> /HCl	385, 355 , 295 $\pm$ , 275, 266 $\pm$
NaOAc	384, 325 $\pm$ , 269
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	430 $\pm$ , 370 , 300 $\pm$ , 260

En medio neutro:

- Hidroxilo libre en posición 5 : Positivo (R-5 = 267).
- Sustituyentes conjuntos en 3' y 4' : Positivo (CRF > 83).
- Sustituyentes en posiciones 6 y/ú 8 : Poco probable.
- C-glicósido en 6 y/ú 8 : Poco probable.
- Esqueleto estructural básico: Luteolina

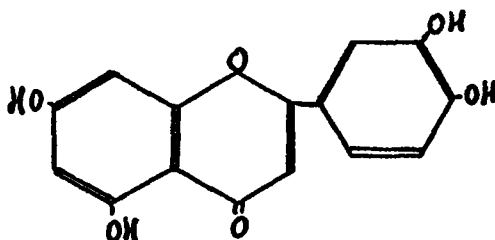
Con reactivos alcalinos:

- Hidroxilo en posición 4' libre : Positivo.
- Hidroxilo en posición 7 libre : Positivo.

Con  $\text{AlCl}_3$  ,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  y  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ :

Agrupación O-hidroxílica libre en 3' y 4' : Positivo.

Estructura probable: Luteolina.



Análisis de azúcares en los líquidos del hidrolizado:

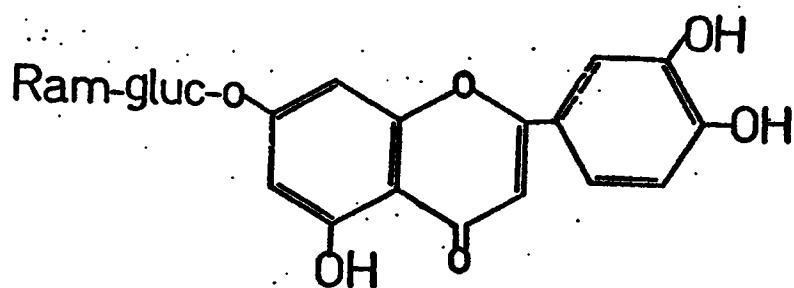
Resultado:        Glucosa - Positivo.  
                      Ramnosa - Positivo.

Resultado final:-

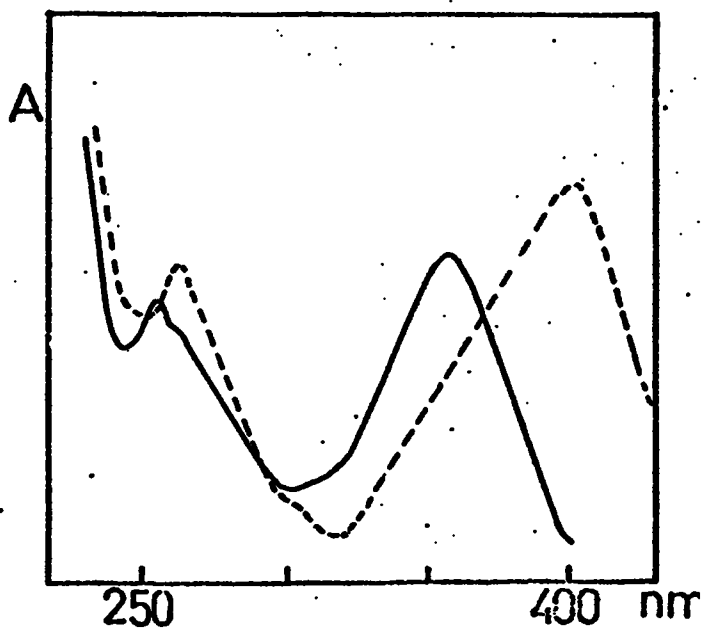
Se identifica éste compuesto como el  
7-Ramnoglucósido de la Luteolina.



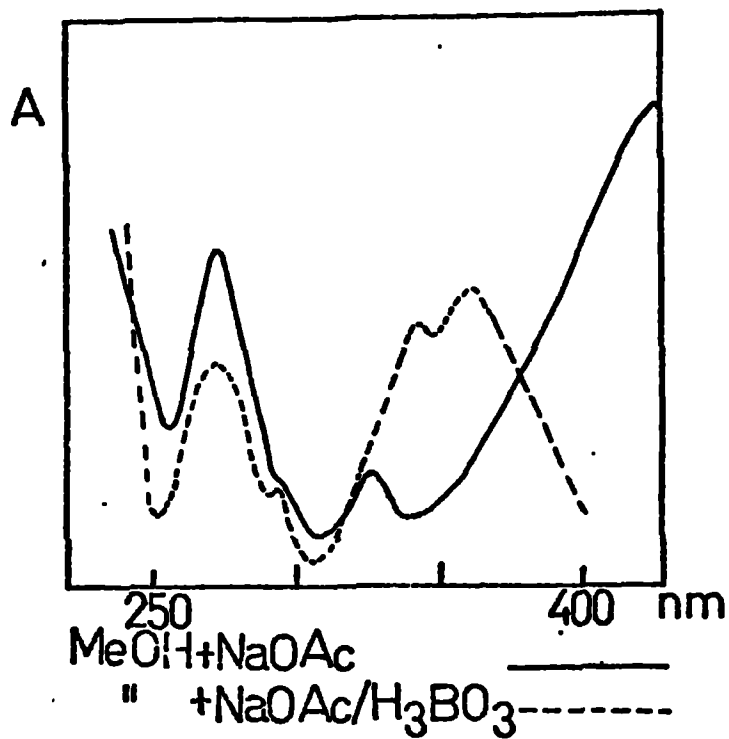
## LUTEOLINA 7-RUTINOSIDO



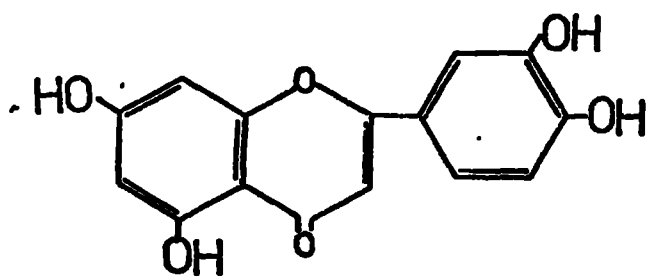
MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -



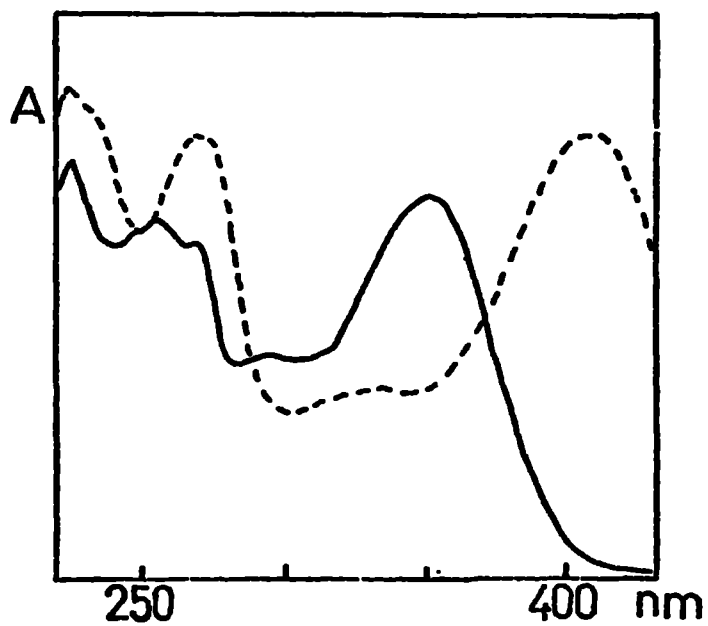
MeOH+AlCl<sub>3</sub> \_\_\_\_\_  
" +AlCl<sub>3</sub>/HCl -----

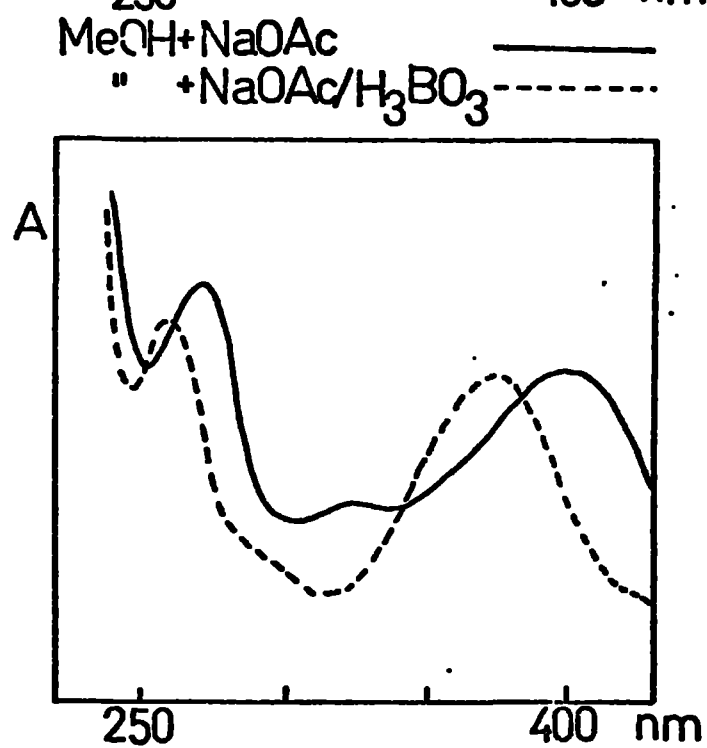
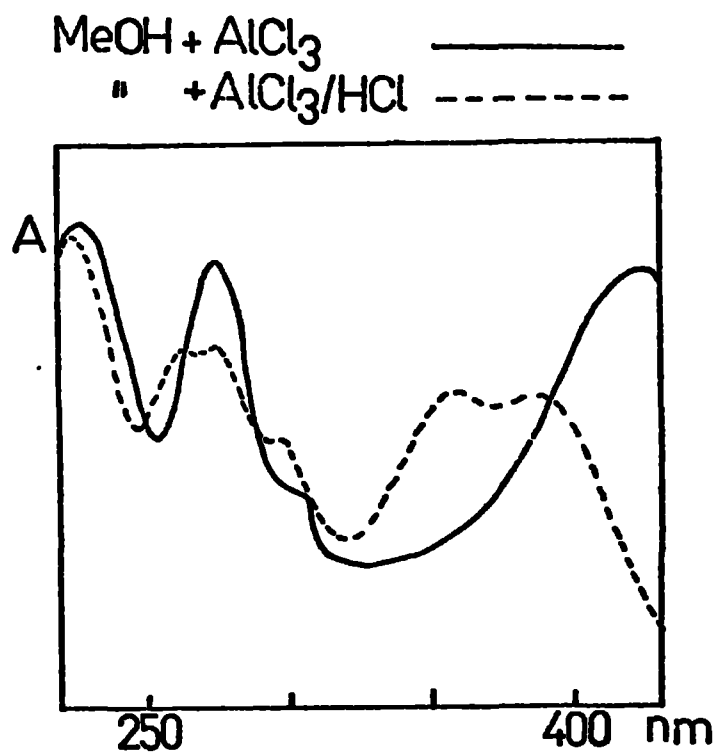


## LUTEOLINA



MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe - - - - -





3.2.3. II.- CORTEZA

El material se trata de modo similar al seguido en la hoja. El concentrado del extracto metanólico se cromatografía por columna de Sephadex LH-20 con el eluyente MEA. Se aprecian tres grupos de fracciones más significativas:

1ª FRACCIONES 15-19

2ª FRACCIONES 20-22

3ª FRACCIONES 23-26

1ª.- FRACCIONES 15 - 19

Se concentran y cromatografían de forma preparativa sobre papel, siguiendo las mismas técnicas empleadas en la hoja.

Cromatografía preparativa:

Whatman 3MM (&), Poliamida (&&).

Técnica monodimensional descendente (&), ascendente (&&).

Saturación 3 horas (&) y media hora (&&).

Valores de los Rf obtenidos:

<u>Eluyentes</u>	<u>Problema A</u>	<u>Problema B</u>
Ac.Acético 15% (&)	0,75	0,72
T.B.A (&)	0,52	0,46
Nitrometano.Metanol		
5.2 (&&)	0,60	0,32

Reacciones de color :

Las dos sustancias aisladas (Problemas A y B), dan respuestas cromogénicas de flavanonas.

Análisis espectrofotométrico :

<u>Medio</u>	<u>Problema A</u> <u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	326 , 285
AlCl <sub>3</sub>	383 , 309
NaOAc	329 , 283

Por el estudio de los espectros se trata de una flavanona con hidroxilo libre en posición 5 y cuya posición 7 esta ocupada.

Problema B

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	328 , 286
AlCl <sub>3</sub>	383 , 309
NaOAc	330 , 286

Por el estudio de las respuestas se trata de una flavonona con hidroxilo libre en posición 5 y sustituido en posición 7.

Hidrólisis ácida.-

Se practica una hidrólisis ácida con cada uno de los dos compuestos. Se cromatografían los extractos etéreos donde se hallan las agliconas.

Cromatografía preparativa de las agliconas:

(&) Whatman 3MM

(&&) Poliamida.

(&) Descendente y (&&) descendente.

Saturación 3 horas(&) y 1 hora (&).

Valores de los Rf hallados para los distintos problemas:

<u>Eluyentes</u>	<u>Soporte</u>	<u>Aglicona A</u>	<u>Aglicona B</u>
Ac.Acético 30%	What.	0,67	0,54
N.M 5.2	Poliam.	0,58	0,33

Análisis espectrofotométrico de las agliconas:

<u>Aglicona A</u>	
<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	326 <sup>a</sup> , 289
AlCl <sub>3</sub>	376 , 310
NaOAc	323 , 290 <sup>a</sup>

<u>Aglicona B</u>	
<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	326 <sup>a</sup> , 288
AlCl <sub>3</sub>	378 , 312
NaOAc	325 , 290 <sup>a</sup>

De las respectivas respuestas espectrofotométricas en U.V. se deduce que las dos agliconas de flavononas poseen hidroxilos libres en 5 y 7.

Los datos obtenidos hasta ahora para las dos agliconas coinciden con los de hesperetina y eriodictiol, respectivamente.

Comprobación cromatográfica frente a patrones de Hesperetina y Eriodictiol.

Whatman nº 1, técnica descendente (&).

Poliamida, técnica ascendente (&&).

Saturación de cámaras 1 hora.



<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona A</u>	<u>Hesperetina</u>	
Ac.Acético 30 % (&)	0,67	0,68	(1)
B.A.W 4.1.5 (&)	0,90	0,90	(1)
N.M 5.2 (&&)	0,60	0,60	(2)

(1). Valores coincidentes con los dados por Harborne, 1967.

(2). Valores coincidentes con los dados por Albach y Redman , 1969.

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona B</u>	<u>Eriodictiol</u>	
Ac.Acético 30 % (&)	0,55	0,55	(1)
B.A.W 4.1.5 (&)	0,85	0,86	(1)
N.M 5.2 (&&)	0,34	0,34	(2)

Las referencias (1) y (2) son de la misma procedencia que en el caso de la hesperetina.

#### Análisis de azúcares en los líquidos acuosos de los hidrolizados.

En los dos problemas A y B, son positivos los análisis de azúcares, con la detección de Glucosa y Ramnosa.

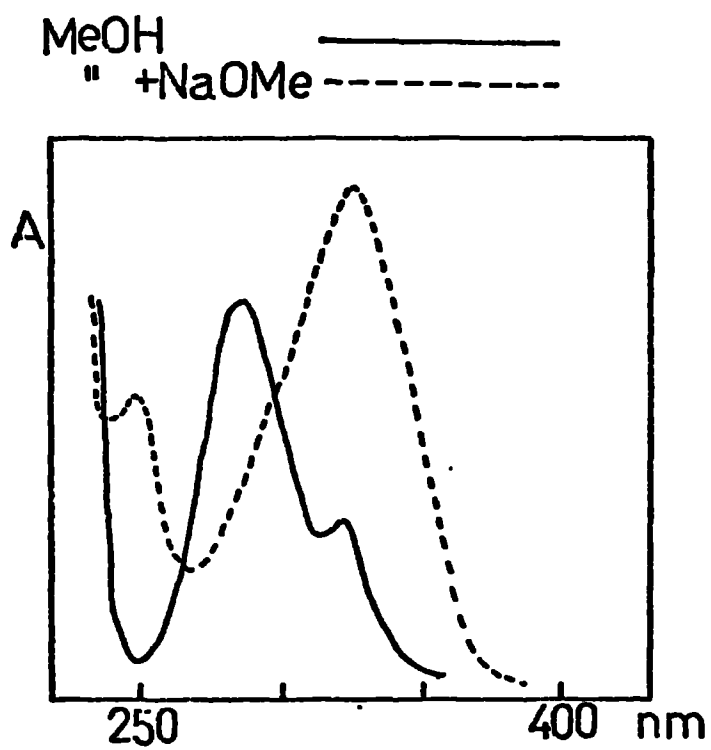
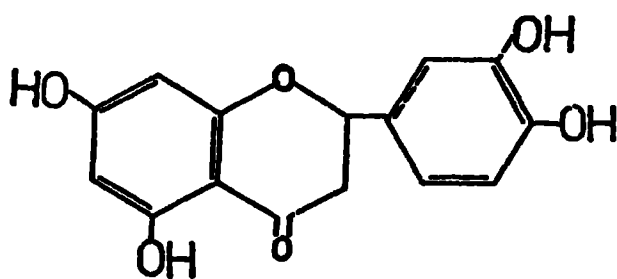
#### RESULTADO FINAL.-

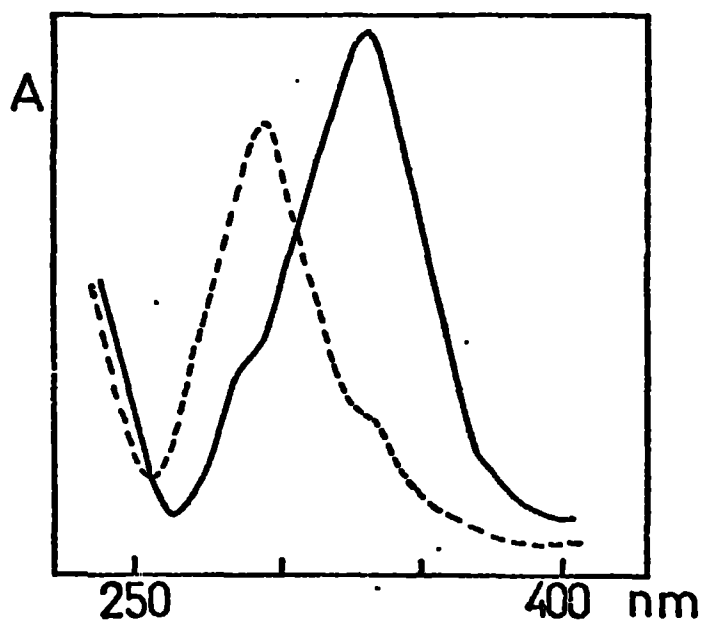
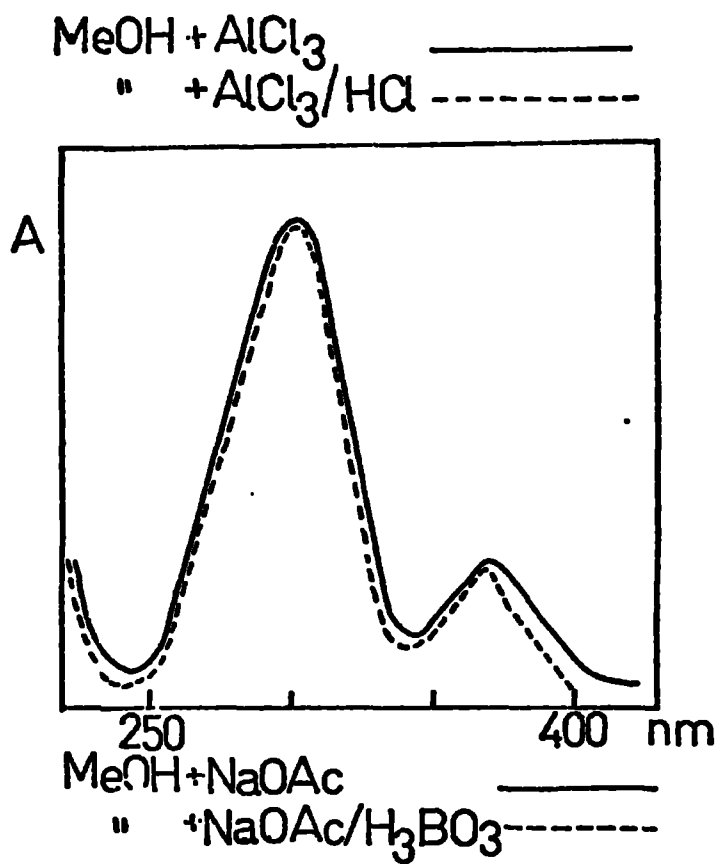
Se identifican los problemas:

A: 7- Ramnoglucósido de Hesperetina

B: 7- Ramnoglucósido de Eriodictiol.

## ERIODICTIOL





### 2º FRACCIONES 20 - 22

Estas fracciones son tratadas igual que las anteriores, al someterlas a cromatografía preparativa, con los eluyentes Ac. acético 15 % y T.B.A. 3.1.1 , cuyos valores de Rf, así como las respuestas cromogénicas y espectrofotométricas, son similares a las de las fracciones B 1, B 2, y C ya estudiadas en el primer conjunto de fracciones de la hoja, y que se identificaron como : 6-C-glucosil diosmetina, 6-8-diC-glucosil apigenina y xilosil vitexina.

### 3º FRACCIONES 23-- 26

El conjunto de fracciones se cromatografía de forma preparativa del modo habitual. Entre otras se separan dos bandas bien delimitadas que corresponden por sus análisis cromogénicos, cromatográficos y espectrofotométricos a determinadas sustancias ya identificadas en la hoja : 7-ramnoglucósido de la luteolina y 7-ramnoglucósido de la diosmetina.

HIDROLISIS DEL EXTRACTO METANOLICO  
DE CORTEZA

El extracto metanólico de corteza fué tratado durante dos horas con HCl 2N y extraído a continuación con éter etílico para obtener sus agliconas. Posteriormente se practica una extracción con acetato de etilo para separar los C-glicósidos.

PARTE A :

El residuo etéreo es cromatografiado en columna de Sephadex LH-20, y como eluyente MEA. Las fracciones más características según el análisis espectrofotométrico inicial son :

1º	Fracciones	25-28
2º	"	29-30
3º	"	31-34
4º	"	36-38
5º	"	45-49
6º		50-55

Cada grupo de estas fracciones se reúnen y concentran a baja temperatura, para posterior análisis.

1º.- FRACCIONES 25-28.

Por los procedimientos anteriormente expuestos, en el estudio de las agliconas de flavanonas, se aíslan e identifican las siguientes agliconas: Hesperetina y Eriodictiol.

2º.- FRACCIONES 29-30.

Por medio de la cromatografía preparativa se aíslan tres agliconas con valores de  $R_f$  y respuestas espectrofotométricas idénticas a las obtenidas para las agliconas : Diosmetina, Crisoeriol y Apigenina, anteriormente aisladas e identificadas en la hoja.

3º.- FRACCIONES 31-34.Cromatografía preparativa.-

Whatman 3 MM.

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

EluyentesAglicona A

Ac. Acético 60 %	0,42
T.B.A 3.1.1	0,60

Reacciones de color:

Respuesta típica de flavonol.

Estudio espectrofotométrico en U.V.:

<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	375, 340 <sup>a</sup> , 273 <sup>a</sup> , 258
NaOMe	327 desc., 280 <sup>a</sup> , 246
AlCl <sub>3</sub>	435, 366 , 315 , 267 , 245
AlCl <sub>3</sub> /HCl	430, 362 , 310 , 266 , 245
NaOAc	390, 328 , 280 , 260 <sup>a</sup> ,
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	376, 335 <sup>a</sup> , 272 , 255

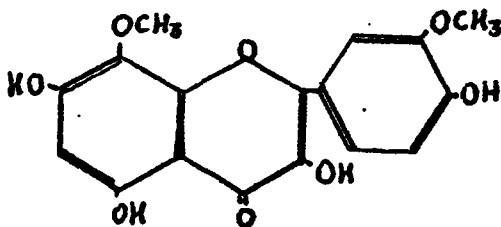
Las respuestas son de una flavona con hidroxilos libres en las posiciones 3, 5, 7 y 4', que no posee agrupación dihidroxílica en 3' y 4'.

Hidrólisis alcalina:

Se realiza por los procedimientos ya descritos con el siguiente resultado:

Ac. Vaníllico : Positivo.

Estructura mas probable: Limocitrina.



Comprobación cromatográfica:

Whatman nº 1

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona A</u>	<u>Limocitrina</u>
Ac.Acético 50 %	0,45	0,45 (1)
T.B.A 3.1.1	0,60	0,61
B.A.W 4.1.5	0,75	0,75

(1) Obtenido por Horowitz, 1961

Resultado final:

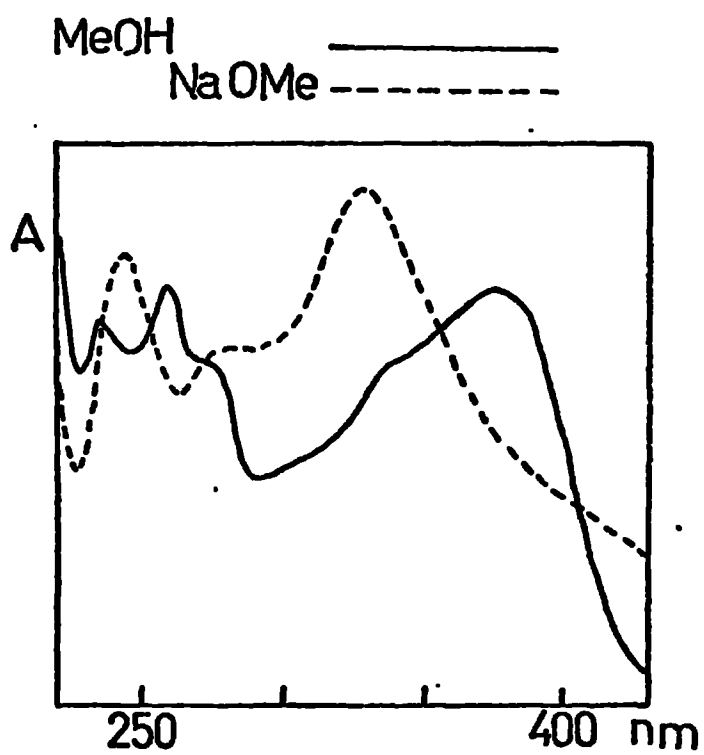
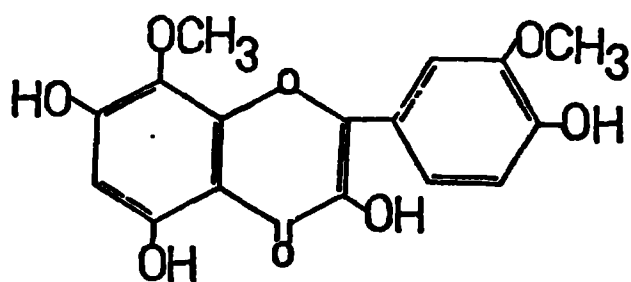
Se identifica la aglicona A como la  
limocitrina : 3,5,7,4' hidroxí, 8,3'dimetoxi flavona.

42.- FRACCIONES 36-38.

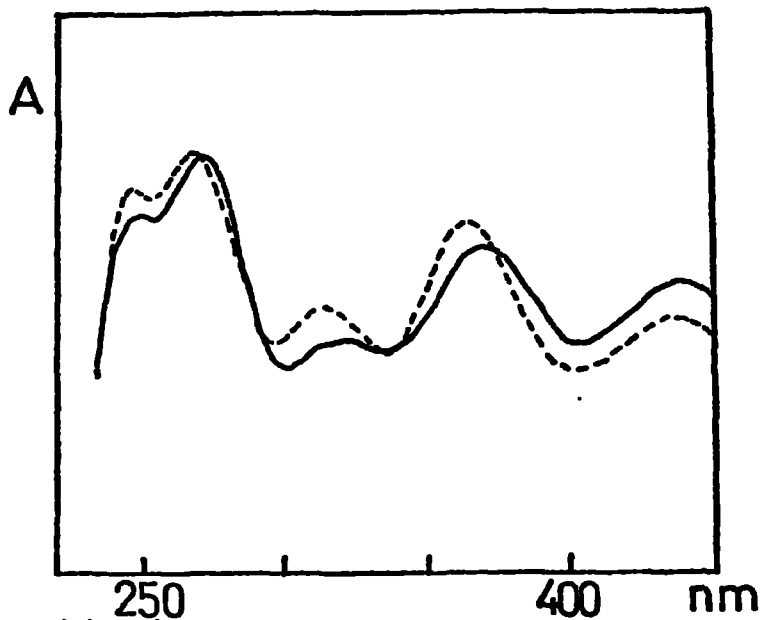
Por los mismos procedimientos  
se aísla de éste conjunto de fracciones una aglicona  
con las mismas respuestas cromatográficas y espectro-  
fotométricas que la flavona aislada en hoja : luteolina.



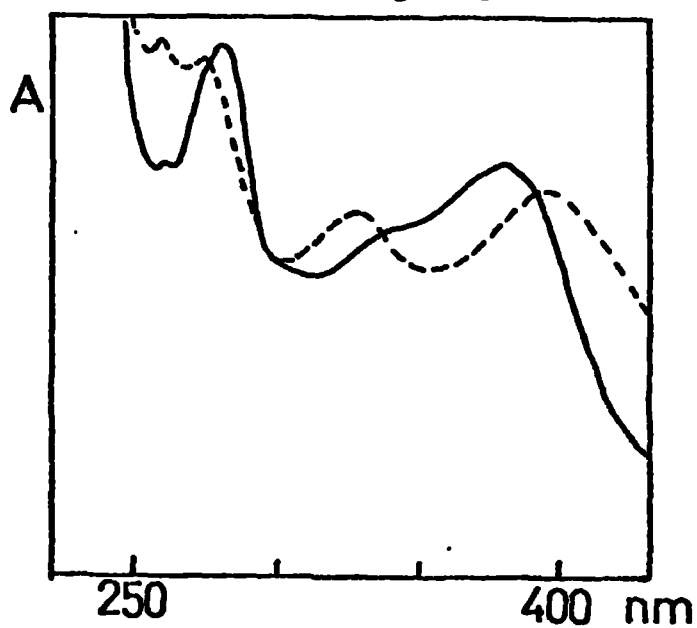
## LIMOCITRINA



MeOH+AlCl<sub>3</sub> —————  
" +AlCl<sub>3</sub>/HCl - - - - -



MeOH+NaOAc —————  
" +NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - - - - -



52 .- FRACCIONES 44 - 49Cromatografía preparativa:

Whatman 3MM, técnica monodimensional descendente.

Saturación 3 horas.

EluyentesFracción A

Ac.Acético 50 % 0,36

T.B.A 3.1.1 0,68

Reacciones de color: Respuesta típica de flavonol.

Estudio espectrofotométrico de la aglicona:

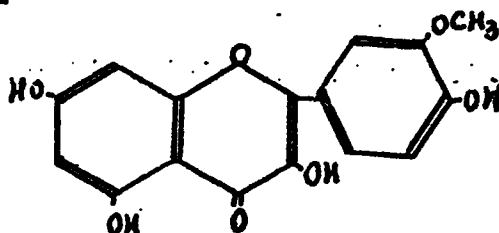
<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	370 , 326 <sup>a</sup> , 306 <sup>a</sup> , 268 , 252
NaOMe	435 desc. , 330 , 270 ,240
AlCl <sub>3</sub>	430 , 361 <sup>a</sup> , 300 <sup>a</sup> , 265
AlCl <sub>3</sub> /HCl	427 ,355 , 300 <sup>a</sup> , 270 <sup>a</sup> ,260 ,240 <sup>a</sup>
NaOAc	390 desc. , 320 , 274 ,260 <sup>a</sup>
NaOAc/BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	377 , 326 <sup>a</sup> , 302 <sup>a</sup> , 270 <sup>a</sup> ,255

Estudio de las respuestas:

-Hidroxilo libres en 3, 5, 7 y 4'

-No posee agrupación dihidroxílica en 3'- 4'

Las constantes espectrofotométricas coinciden con las de la Isorhamnetina

Estructura más probable:

Comprobación cromatográfica:Valores de los Rf

3

<u>Eluyentes</u>	<u>Fracción A</u>	<u>Isorhamnetina</u>
B.A.W 4.1.5	0,73	0,72 (1)
Ac.Acético 60 %	0,40	0,40 (2)

(1) Valores dados por Geissman, 1962.

(2) " " " Lebreton, 1967.

RESULTADO FINAL.-

Se identifica esta aglicona como  
Isorhamnetina.

62.- FRACCIONES 50-55.Cromatografía preparativa:Valores hallados sobre Whatmann 3MM:

<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona-</u>
Ac.Acético 60%	0,40
T.B.A. 3.1.1.	0,60

Estos valores de Rf coinciden con los dados por Lebreton, 1967 y Mabry, 1970 para la quercetina.

Reacciones de color:

Típica reacción de flavonoles.

Estudio espectrofotométrico en U.V. :

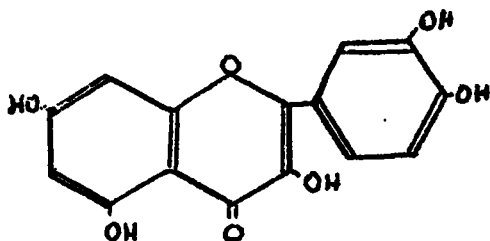
<u>Medio</u>	<u>Máximos e inflexiones en nm</u>
Metanol	372 , 300 <sup>a</sup> , 270 <sup>a</sup> , 255
NaOMe	321 desc. , 250 <sup>a</sup>
AlCl <sub>3</sub>	458 , 330 , 305 <sup>a</sup> , 272
AlCl <sub>3</sub> /HCl	430 , 360 , 300 <sup>a</sup> , 265
NaOAc	390 desc. , 330 , 275 , 258 <sup>a</sup>
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	388 , 300 , 260

Estudio estructural:

Flavona con hidroxilo en 3, 5, 7 y 4' libre.

Posee agrupación dihidroxílica libre en 3' y 4'.

Esqueleto estructural básico : Quercetina ó derivado.

Estructura más probable:Comprobación cromatográfica:

Whatman nº 1

Técnica monodimensional descendente.

Saturación 1 hora.

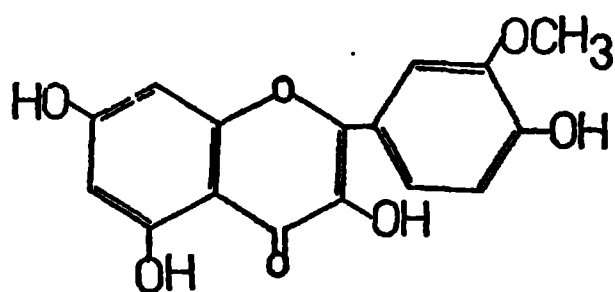
Valores de los R<sub>f</sub> hallados para la aglicona frente a patrón de Quercetina, purificada por nosotros:



<u>Eluyentes</u>	<u>Aglicona</u>	<u>Quercetina</u>
Ac. acético 30 %	0,30	0,30
B.A.W 4.1.5	0,64	0,64
Isopropanol. Agua 6.4	0,67	0,68

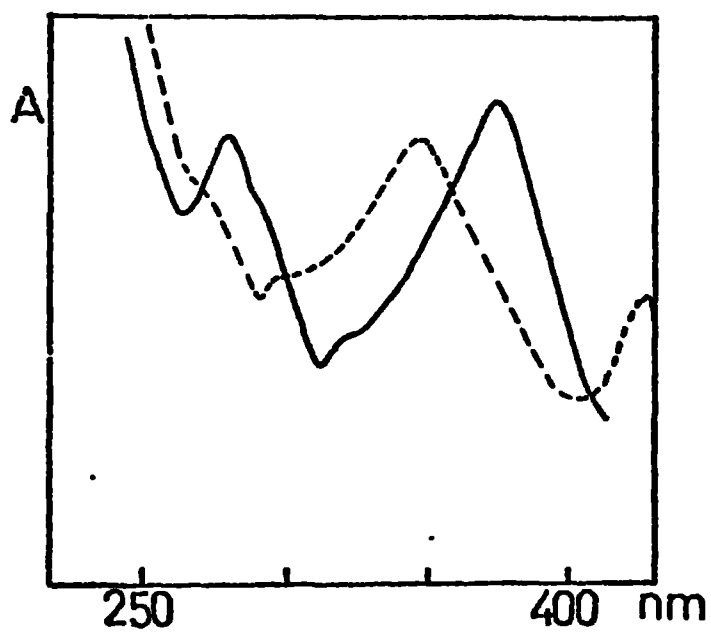
Resultado final.-

Se identifica la aglicona como el  
flavonol Quercetina (3,5,7,3', 4' penta-OH flavona):.

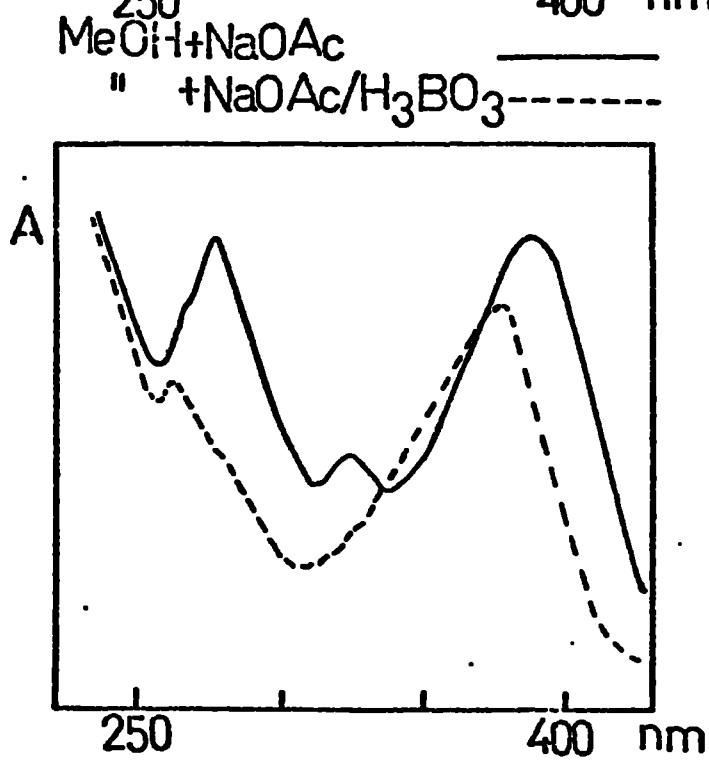
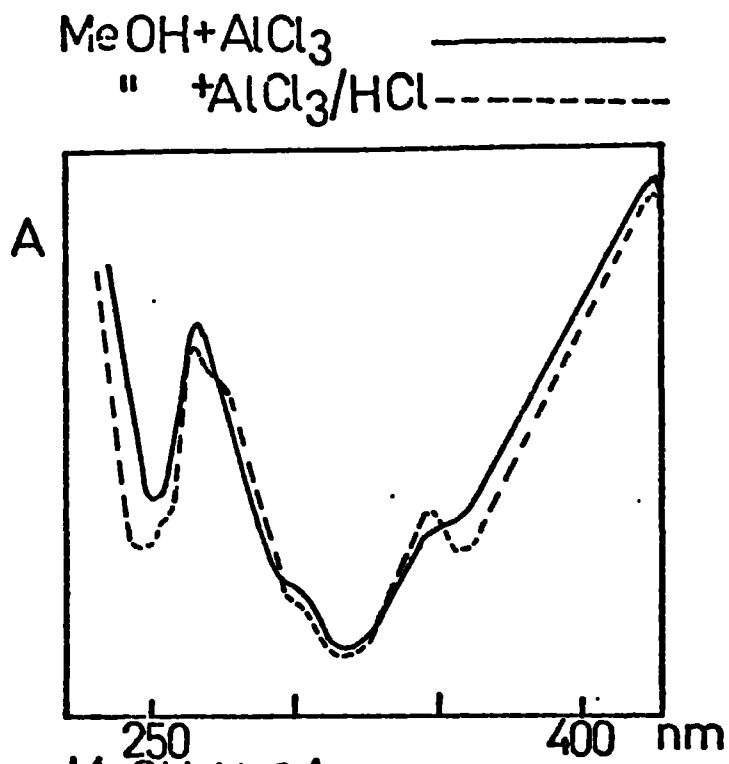
## ISORHAMNETINA



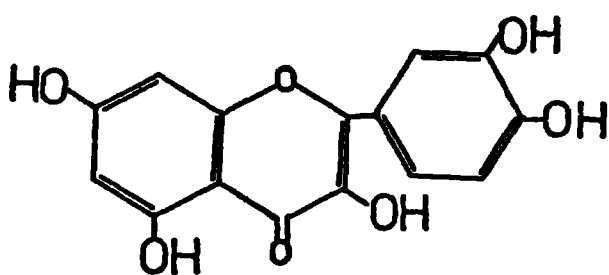
MeCH   
" + NaOMe 



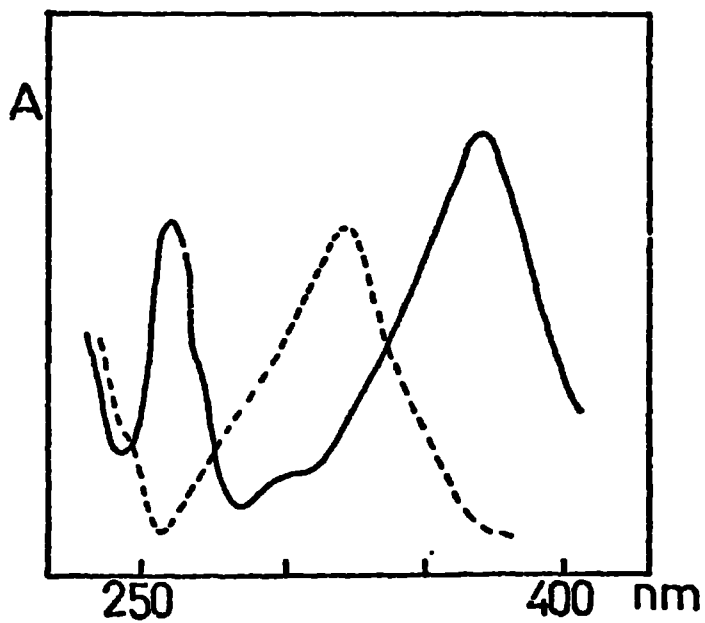


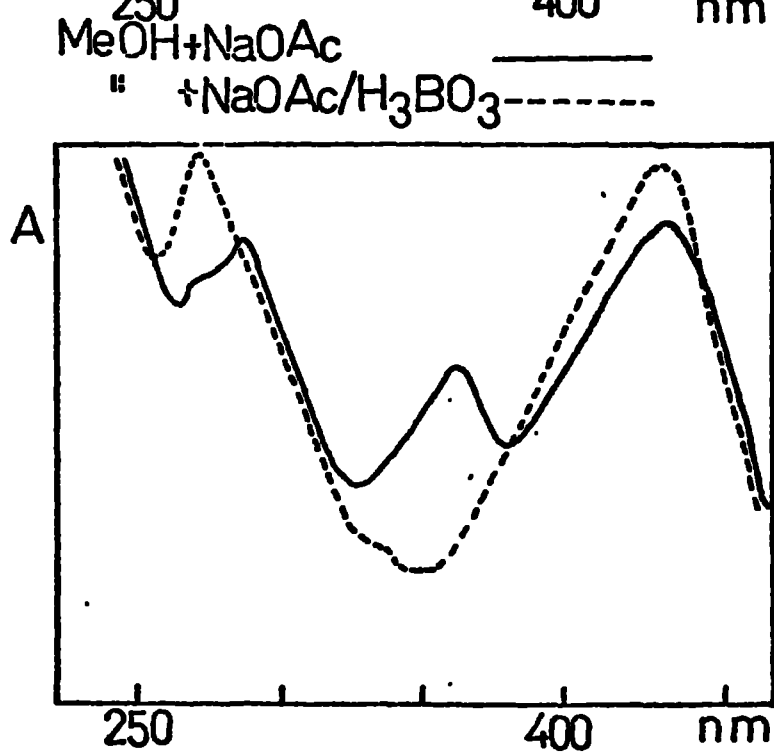
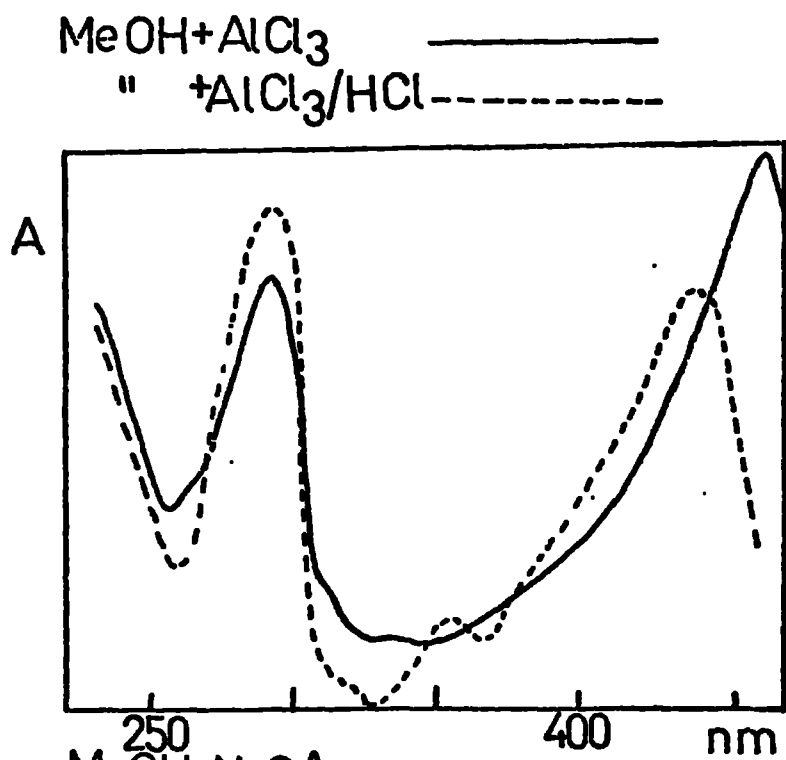


## QUERCETINA



MeOH \_\_\_\_\_  
" + NaOMe -----





PARTE B :

El concentrado de acetato de etilo es cromatografiado en columna de Sephadex LH-20 y MBA como eluyente.

Las fracciones más características según el primer estudio espectrofotométrico son:

1ª.- Fracciones 20 - 22.

2ª.- " 23 - 26.

---

1ª.- FRACCIONES 20-22:

Efectuados los sistemáticos estudios espectrofotométricos y cromatográficos habituales; por los idénticos resultados obtenidos con respecto a determinadas fracciones de la hoja, se identifican el 6-C-glucosil diosmetina y el 6-8 di-C-glucosil apigenina.

2ª.- FRACCIONES 23-26 :

Se identifican por los sistemas habituales a dos compuestos hallados en la hoja, formando parte de la Xilosil-vitexina, que son : Vitexina e Isovitexina.

### 3.2.4. III.- FLOR

La flor ha sido estudiada siguiendo los mismos procedimientos que con la hoja y corteza. El exponer nuevamente todos los métodos sería reiterativo, pues ya han sido descritos ; así que sólo exponemos aquellas diferencias observadas en el análisis del resto de los órganos.

El contenido en flavanonas es grande, especialmente en Hesperidina, seguido de Eriocitrina. Ya en el proceso de extracción con metanol se observa un precipitado blanco amarillento formado principalmente por flavanonas.

Los flavonoles le siguen en concentración con la presencia de Limocitrina, Quercetina e Isorhamnetina, así como dos más que no hemos podido identificar.

En menor proporción están las flavonas y los C-glicósidos, habiéndose encontrado los mismos que en la hoja, aunque en menor proporción. Dentro de las flavonas las más abundantes son la Diosmetina -7-ramnogluco-sido y la luteolina-7-ramnogluco-sido.

#### 4. DISCUSION DE RESULTADOS

##### RESUMEN

##### 4.1. PARTE I.-

##### Sephadex.

Por medio de las columnas de Sephadex G-25 Medio y agua se ha demostrado la viabilidad de separar glicósidos de flavonoides, y con las de LH-20 y MEA se pueden aislar tanto los glicósidos como las agliconas de los mismos. Hemos de considerar que los resultados que se obtienen con productos puros, libres de sustancias interferentes de cualquier tipo, difieren en la práctica de los que se pueden conseguir con los extractos vegetales que contienen flavonoides y otras muchas sustancias, de carácter fenólico ó sin él, y que tanto afectan a los volúmenes de elución como al enmascaramiento de las reacciones de color y registros espectrofotométricos. Por todo ello, estas técnicas de cromatografía en columna, se han empleado de modo preparativo para completar seguidamente el proceso de aislamiento

por medio de la cromatografía sobre papel con dos sistemas de elución diferentes (ácido acético al 15 % y T.B.A.). Cuando no se consigue aislar perfectamente un determinado compuesto por los procedimientos anteriores, recurrimos a otros, especialmente a sistemas cromatográficos en papel.

#### Espectros en ultravioleta en medio neutro.--

Para el estudio inicial de las estructuras de las flavonas perfectamente aisladas y purificadas hemos analizado las respuestas de casi todas las conocidas hasta la fecha, cuyos conjuntos de datos los hemos obtenido, bien de los suministrados por los autores más reconocidos en la especialidad de los flavonoides, o bien por los conseguidos personalmente a partir de sustancias puras.

Llegamos a una serie de conclusiones de carácter deductivo, sobre las que se podían objetar ciertas consideraciones, a las que nos anticipamos con los resultados experimentales obtenidos en la identificación de las flavonas aisladas, cuyo estudio preliminar está basado en la aplicación de las citadas conclusiones, seguido de un conjunto de otras técnicas analíticas que han ido comprobando paso a paso

la validez y objetividad del estudio estructural inicial.

#### C-glicósidos.-

Lo expuesto en el apartado anterior sobre flavonas es perfectanente aplicable al análisis inicial de las estructuras de los C-glicósidos, y con la utilización del parámetro DEM y del tipo de respuesta espectral característica, observados en ciertos derivados, nos ha permitido conocer inicialmente la condición de sus estructura básica, lo que hemos comprobado por distintos caminos analíticos.

#### 4.2. PARTE II.-

##### Hoja.

Para el estudio de los flavonoides existentes en este órgano hemos seguido unas técnicas sistemáticas con la finalidad de separar los distintos derivados, continuando seguidamente el análisis estructural de los mismos que iniciamos con las reacciones de color para determinar el grupo, lo que comprobamos inmediatamente con el primer estudio con los espectrogramas en el ultravioleta obtenidos en medio neutro,



que nos informa más ampliamente sobre la presencia ó ausencia de determinados sustituyentes y en el caso especial de las flavonas si son C-glicósidos en 6 y/ó 8 y la calidad de las mismas, lo que constituye una de nuestras más originales aportaciones en el conjunto de esta tesis. Por medio de los reactivos alcalinos y los formadores de complejos, ampliamos el estudio espectrofotométrico. La cromatografía sobre papel y capa fina, la hidrólisis alcalina aplicada sólo en determinados casos, y la hidrólisis ácida para la caracterización de los azúcares y las agliconas, complementan a las demás técnicas para la identificación de cada flavonoide aislado.

Deseamos destacar que en la identificación de determinados glicósidos de flavonoides , como el glucósido del Crisoeriol y la Xilosil-vitexina, no encontramos referencias bibliográficas sobre el hallazgo de los mismos en el C.Limonum var. Eureka. Horowitz, 1960, aporta el Crisoeriol, pero en forma de aglicona encontrado en corteza y no en la hoja. Los C-glicósidos identificados en hoja 6-C-glucosil Diosmetina y 6-8 diC-glucosil Apigenina, han sido aislados por otros autores en corteza de limón. Gentili y Horowitz 1968.

Corteza.-

De los derivados flavonoideos identificados por nosotros en la corteza, expresaremos que están en concordancia con los citados por otros autores.

Los flavonoles son más fáciles de aislar e identificar en forma de aglicona a partir del hidrolizado total del extracto. Ello podría explicarse por tener estos compuestos sus uniones heterosídicas muy lábiles.

Flor.-

Respecto a la flor con muy escasa bibliografía sobre su dotación flavonoidea, hemos observado que existen una gran cantidad de los mismos. Los resultados que hemos obtenido, deben ser el comienzo de una investigación más exhaustiva.

Se ha expuesto concisamente los resultados obtenidos y las técnicas seguidas sobre estas dos partes, para no incidir repetidamente en una misma descripción.

## 5. CONCLUSIONES

1ª.- Por medio de columnas de Sephadex, LH-20, G-25 Medio y G-25 Fino, utilizando distintos disolventes hidroalcohólicos y agua, es posible la separación de glicósidos flavonoideos y de sus agliconas.

2ª.- Hemos realizado un estudio de las respuestas espectrales en el ultravioleta de numerosas flavonas en medio neutro, hallando una relación significativa entre el tipo de respuesta y los sustituyentes que las originan, lo que nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- A) Por el CRF podemos saber si existen sustituyentes conjuntos en las posiciones 3' y 4'.
- B) Si en anillo B no existen sustituyentes.
- C) La presencia o ausencia de hidroxilo en posición 5.
- D) La presencia de sustituyentes en 6 y/ó 8.
- E) Distinguir los C-glicósidos en 6 y/ó 8.
- F) Diferenciar las flavonas con estructura original de la apigenina y de la luteolina.

3ª.- El estudio de los espectros de las flavonas en medio neutro es aplicado a los C-glicósidos y con el empleo del parámetro DEM, hemos podido analizar el origen de las estructuras básicas de los mismos,

que se derivan: de la Apigenina, Crisoeriol, Diosmetina ó Luteolina.

4ª.- De los extractos metanólicos de la hoja de limón Eureka, por procedimientos cromatográficos en columna, papel y capa fina, así como del estudio de las fracciones aisladas por reacciones de color, estudio espectral en medio neutro, y con reactivos alcalinos y metálicos, y comprobando además por cromatografía en papel y capa fina, hemos identificado los siguientes glicósidos flavonoideos:

7-glicósido del Crisoeriol  
7-glucósido del Crisoeriol  
6-C-glucosil Diosmetina  
6-8-diC-glucosil Apigenina  
Xilosil-vitexina  
7-glucósido de Apigenina  
7-ramnoglucósido de Diosmetina  
7-ramnoglucósido de Luteolina  
Hesperidina.

5ª.- De los extractos metanólicos de corteza de Citrus Limonum var. Eureka, por procedimientos idénticos que los seguidos en el estudio de la hoja, hemos conseguido identificar:

7-ramnoglucósido de Luteolina  
7-ramnoglucósido de Diosmetina  
6-C-glucosil Diosmetina  
6-8-diC-glucosil Diosmetina  
Xilosil-vitexina  
Hesperidina  
Eriocitrina

Y las agliconas de los flavonoles:

Limocitrina  
Isorhamnetina  
Quercetina.

6ª.- De los extractos metanólicos de flor del  
Citrus Limonum var. Eureka y por los procedimientos  
ya citados se han aislado e identificado:

7-ramnoglucósido de Luteolina  
7-ramnoglucósido de Diosmetina  
6-C-glucosil diosmetina  
6-8- diC-glucosil Diosmetina  
Xilosil-vitexina  
Hesperidina  
Eriocitrina

Y las agliconas de los flavonoles:

Limocitrina  
Isorhamnetina  
Quercetina.

## 6. BIBLIOGRAFIA

# **BIBLIOGRAFIA**

---

- ALBACH, R.F. REDMAN, G.H.- 1969.- "Composition and inheritance of flavanones in citrus fruits". *Phytochemistry*, 8, 127-143.
- ARMENTANO, L., BENTSATH, A., BERES, T., RUSZNYAK, ST., y SZENT-GYORGYI.- 1936.- "Ueber den Einfluss von Substanzen der Flavongruppe auf die permeabilität der Kapillaren (Vitamin P)". *Deut. Med. Wochenschr.*, 62, 1325-1328.
- BATE-SMITH, E.C.- 1948.- "Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts" *Nature*. 161, 835.
- BATE-SMITH, E.C.- 1949.- *Biochem. Soc. Symp. (Cambridge)* 3, 62.
- BATE-SMITH, E.C.- 1954.- *Biochem. J.* 58, 122.
- BRIGGS, L.H. y LOCKER, R.H.- 1951.- "Chemistry of New Zealand Melicope species. VII. Some observations on the relation between the constitution of some flavonol derivates and their acidity, basicity, colors with ferric chloride, and ultraviolet absorption spectra". *J. Chem. Soc.* 3136-3142.
- BRYANT, E.F.- 1950.- "A note on the differentiation between flavonoid glycosides and their aglycons". *J. of the Am. Pharm. Ass. Scientific Edit.* 34, 8, 480.
- CAMBIE, R.C.- 1959.- *Chem. and Ind.* 87-88.
- CASAS, A., GONZALEZ DE BUITRAGO, M., y PRIMO, E.- 1975.- "Flavonoides de las hojas de lima mejicana y naranjo Valencia Late. I". *Rev. Agroq. Tecnol. Alim.* 15, 1, 77-88.
- COFFIN, D.E.- 1971.- "A method for the isolation and identification of the flavanone glycosides of Citrus fruits juices". *J. Agr. Food Chem.* 19, 3, 513-516.
- CONSDEN, R., GORDON, A.H., y MARTIN, A.J.P.- 1944.- *Biochem. J.* 38, 224.
- CHOPIN, J., ROUX, B., y DURIX, A.- 1964.- "Glycosides flavoniques de l'écorce de citron". *Compté Rendus Academie Science de Paris*, 259, 13, 18, 3111-3113.

- DAVIDEK, I.- 1961.- "Stabilizing effects of flavonoids on L-ascorbic acid". Biochem. J. 26, 93-98.
- ERDTMAN, H.- 1944.- Svensk, Kem. Tidskr. 56, 2-14, 26-31, 95-101, 134-42.
- GEISSMAN, T.A.- 1962.- "The chemistry of flavonoids compounds". Pergamon Press. Oxford. Londres. N.Y. y Paris. 51.
- GEISSMAN, T.A. y HARBORNE, J.B.- 1956.- "The ultraviolet absorption spectra of phenolic plant pigments. Polyhydroxyaurones". J. Am. Chem. Soc. 78, 832.
- GEISSMAN, T.A. JORGENSEN, E.C., y HARBORNE, J.B.- 1953.- "Effect of Al Cl<sub>3</sub> on absorption spectra of anthocyanins". Chem. Ind. 1389.
- GEISSMAN, T.A., y JURD, L.- 1955.- "The anthocyanin of spirodella oligomiza". Arch. Biochem. Biophys. 56, 259-263.
- GELOTTE, B.- 1960.- "Studies on gel filtration". J. Chromatog. 3, 330.
- GENTILI, B., y HOROWITZ, R.M.- 1968.- "Flavonoids of Citrus. IX. Some new C-glycosyflavones and a nuclear magnetic resonance method for differentiating 6- and 8-C-glycosyl isomers". J. Org. Chem. 33, 4, 1571-1577.
- GERNGROSS, O., y RENDA, N.- 1966.- Ann. Chem. 691, 186.
- GONZALEZ-SICILIA, E.- 1960.- "El cultivo de los agrios". Instituto Nacional de Investigaciones Agronomicas. Madrid.
- GUPTA, S.R., y SESMADRI, T.R.- 1952.- Proc. Indian, Acad. Sci. 35, 242-48.
- HALUK, J.P., y METCHE, M.- 1970.- "Analyse qualitative de la reduction electrolytique des flavones, flavonols et flavanones". Chimie analytique, 52, (11). 1245-55.
- HARBORNE, J.B.- 1954.- "Use of alkali and aluminum chloride in the spectral study of phenolic plant pigments". Chem. Ind. (London), 1142-43.



- HARBORNE, J.B.- 1959.- "The chromatography of the flavonoid pigments". J. Chromatography. 2, 581-604.
- HARBORNE, J.B.- 1965.- Phytochemistry, 4, 107.
- HARBORNE, J.B.- 1967.- "Comparative biochemistry of the flavonoids". Academic Pres. London, New York.
- HARBORNE, J.B., y SHERRAT, H.P.A.- 1957.- Biochem. J. 65, 23 p.
- HORHAMMERL, L. y HANSEL, R.- 1952.- "Analysis of flavones I. Stoichiometry of dissolved metal salt complexes of rutin and quercetin". Arch Pharm. 285, 438-444.
- HOROWITZ, R.M.- 1956.- "Flavonoids of Citrus. I. Isolation of diosmin from lemons (Citrus limon)". J. Org. Chem. 21, 1184-85.
- HOROWITZ, R.M.- 1957.- "Flavonoids of Citrus. II. Isolation of a new flavonol from lemons". J. Am. Chem. Soc. 79, 6561-62.
- HOROWITZ, R.M. y GENTILI, B.- 1960.- Flavonoid compounds of Citrus. III. Isolation and structure of eriodictiol glycoside". J. Am. Chem. Soc. 82, 2803-06.
- HOROWITZ, R.M. y GENTILI, B.- 1960.- Flavonoids of Citrus. IV. Isolation of some aglycons from the lemon. J. Org. Chem. 25, 2183-87.
- HOROWITZ, R.M., y GENTILI, B.- 1961.- "Flavonoids of Citrus V. Structure of limocitrine, "J. Org. Chem. 26, 2899-2902.
- HOROWITZ, R.M. y GENTILI, B.- 1960.- Nature, Lond. 185, 319.
- HOROWITZ, R.M. y GENTILI, B.- 1964.- Structure of vitexin and isovitexin." Chem. Ind. 498.
- HOROWITZ, R.M., y GENTILI, B.- 1966.- Chemistry and Industry. Abril. 625-27.
- IZMAILOV, N.A. y SHRAIBER, M.S.- 1938.- Farmatsiya, 3, 1.
- JANSON, J.C.- 1967.- "Adsorption fenomen® in Sephadex". J. Chromatog. 28, 12.
- JOHNSTON, K.M., STERN, D.J. y WAISS, Jr. A.C.- 1968.- "Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20". J. Chromatog. 33, 539.

- JURD, L.- 1956.- "A spectrophotometric method for the detection of o-dihydroxil groups in flavonoid compounds". Arch. Biochem. Biophys. 63, 376-81.
- JURD, L., GEISSEMAN, T.A. y SEIKEL, M.K.- 1957.- "Flavonoid constituents of *Spirodela Oligorhiza*". Arch. Biochem. Biophys. 67, 284.
- JURD, L. y HOROWITZ, R.M.- 1957.- "Flavonols. Structure of azalein". J. Org. Chem. 22, 1618.
- JURD, L. y HOROWITZ, R.M.- 1961.- "Spectral studies on flavonoid compounds. III. Polyhydroxychalconas". J. Org. Chem. 26, 2561-63.
- KARTNIG, T. y WEGSCHALDER, O.- 1971.- J. Chromatog. 61, 375-77.
- KING, F.E., GRUNDUN, M.F. y NEILL, K.G.- 1952.- J. Chem. Soc. 4580.
- KOCH, J.E. y KRIEG, W.- 1938.- Chemiker-Zth, 72, 140.
- KOEPPEN, B.H. y ROUX, D.G.- 1965.- "C-glycosylflavonoids. The chemistry of orientina and iso-orientina". Biochem. J. 97, 444-48.
- KUHN, R. y LEDERER, E.- 1931.- Ber. dtsh. Chem. Ges. 1349.
- LEBRETON, P.- 1828.- "On the crystalline material of small oranges. and the analysis of immature fruit of the hesperides family. "J. Pharm. et de Chim. (ser.2) 14: 377-92.
- LEBRETON, P., JAY, M. y VOIRIN, B.- 1967.- "Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes". Chimie Analytique, 49, 7, 375-83.
- LINDSTEDT, G.- 1950.- Acta Chem. Scand. 4, 55-59, 448-55.
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. y THOMAS, M.B.- 1970.- "The sistematic identification of flavonoid. "Ed. Springer. Verlag. Berlin. Heidelberg. N.Y.
- MANSFIELD, GH, SWAIN, T. y NORDSTROM, G.G.- 1953.- "Identification of flavones by the ultraviolet absorption spectra of their ions". Nature. 172, 23-25.
- MARKHAM, K.R.; SWIFT, W.T. y MARRY, T.J.- 1968.- "A new isoFlavone glycoside from *Baptisia australis*" J. Org. Chem. 33, 1, 462-64.

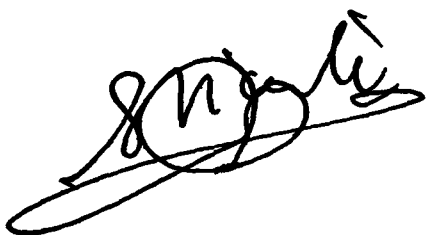
- MARTIN, A.J.P. y SYNGE, R.L.M.- 1941.- Biochem. J. 35, 1358.
- MATAIX, J.J., TOMAS, F. y CARPENA, O.- 1974.- "Flavonoides en el limón Primofiore. I. Fruto:". Rev. Agroq. y Tecnol. Aliment. 14, 1, 100-105.
- MEINHARD, J.E., y HALL, N.F.- 1949.- "Surface chromatography". Anal. Chem. 21, 185.
- MONTORO, R., CASAS, A. y PRIMO, E.- 1974.- "Identificación de flavonoides en el fruto de distintas variedades de naranja (C.Sinensis) II". Rev. Agroq. Tec. Aliment. 14, 2, 271-77.
- MONTORO, R., MALLENT, D., CASAS, A. y PRIMO, E.- 1970.- "Aportación al conocimiento de los flavonoides de la naranja (C.Sinensis) Rev. Agroq. Tecnol. Aliment. 10, 4, 571-73.
- NARASIMHACHARI, N. y SESHADRI, T.R.- 1948.- "A new effect of hydrogen bond formation. Chelation and stability of flavanones". Proc. Indian Acad. Sci. 27A, 223-239.
- NARASIMHACHARI, N. y SESHADRI, T.R.- 1959.- Proc. Indian. Acad. Sci. 30A, 271.
- NARASIMHACHARI, N. y SESHADRI, T.R.- 1950.- Chemic. Abstrat. 44, 1493.
- NEU, R.- 1957.- Mikrochim. Acta, 196.
- WILSON, A.- 1962.- "Fractionation of some plant strogens and their animal excretion metabolites on dextran gels. "Acta. Chem. Scand. 16, 31.
- NORDSTROM, C.B. y SWAIN, T.- 1953.- "Flavonoid glycosides of Dahlia variabilis. I. General Introduction". J. Chem. Soc. 3, 764.
- PAECH, K. y TRACEY, M.V.- 1955.- "Modern methods of plant analysis. Driter band. III, Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- PARTRIDGE, S.M.- 1947.- "Separation of aminoacids, peptides and proteins". Biochem. J. 42, 238.
- RANDERATH, K.- 1974.- "Cromatografía de capa fina" Ediciones Urmo. Bilbao.

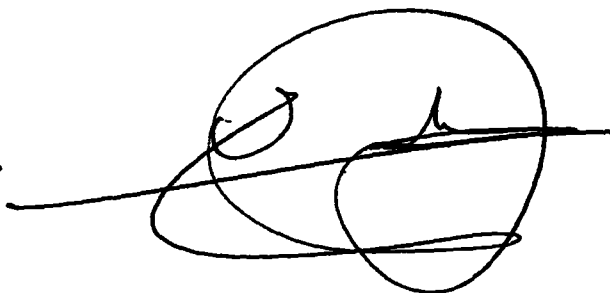
- REITSEMA, R.H.- 1954.- "Characterization of essential oils by chromatography". Anal. Chem. 26, 960.
- RIVAS. Botanica descriptiva. Clasificación de Citrus.
- ROBERTS, E.A.H., CARTWRIGHT, R.A. y WOOD, D.J.-1956.- J.Sci.Food.Agric. 7, 637.
- ROSENBERG, H.R.- 1942.- "Chemistry and physiology of the vitamins". Interscience Publ. Co. New York. 513-18.
- RUSINYAK, ST, y SZENTGYORGYI. A.- 1936.- "Vit. P. Flavonols as vitamins". Nature. 138, 27.
- SARIN, P.S. y SESHADRI, T.R.- 1959.- J. Sci. Ind. Res. (India) 18 B, 129.
- SEIKEL, M.K., CHOW, J.H.S. y FELDMAN, L.- 1966.- Phytochemistry 5/3 439-55.
- SHIMIZU, M., OHTA, G., YOSHIKAWA, T. y KASHIHARA, A.- 1952.- J. Pharm. Soc. Japan, 72, 336-68.
- SHINODA, J. y SATO, S.- 1931.- J. Pharm. Soc. Japan, 51, 578.
- SJOWALL, J.S. y VIHKO, R.- 1966.- "Chromatography of conjugated steroids on lipophilic Sephadex". Acta Chem. Scan. 20, 1419.
- STRAIN, H.H.- 1942.- "Chromatographic adsorption analysis". Interscience Publ. Inc. New York.
- SUSUMU ADACHI.- 1965.- "Thin-layer chromatography of carbohydrates in the presence of bisulfite". J. Chromatography, 47, 295-99
- SWAIN, T.- 1954.- "Spectral studies on phenolic compounds". Chem. Ind. (London) 1480-81.
- TOMAS, F., CARPENA, O. y MATAIX, J.J.- 1972.- "Análisis estructural de flavonoides en UV. I. Reactivos formados de complejos metálicos". An. Real Soc. Esp. Fis.Quim. 68, 115, 2.
- TOMAS, F., CARPENA, O. y MATAIX, J.J.- 1972.- "Análisis estructural en el UV. II. Reactivos alcalinos" An. Real Soc. Esp. Fis.Quim. 68, 123, 2.

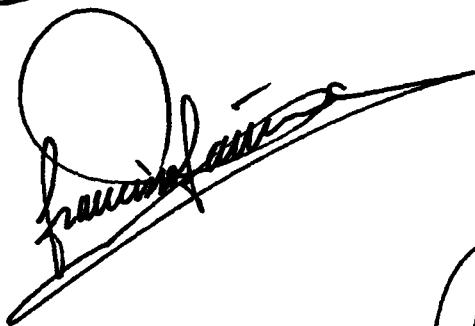
- TOMAS, F., GOMEZ, P., MATAIX, J.J. y CARPENA, O.- 1972.- "Separación cromatográfica de flavonoides con Sephadex". Rev. Agroq. Tecnol. Aliment. 12, 1, 106-110.
- TOMAS, F., MATAIX, J.J. y CARPENA, O.- 1973.- "Indice de desplazamiento típico de los flavonoides en el UV". Ana. Real Soc. Fis. Quim. 69, 357-64.
- TOMAS, F., MATAIX, J.J. y CARPENA, O.- 1972.- "Estudio de glucosidos flavonoides en el Petroselinum Sativum". Rev. Agroq. Tecnol. Aliment. 12, 2, 263-68.
- TOMAS, F., PASTOR, R. y CARPENA, O.- 1973.- "Separación de citroflavonoides con Sephadex". Rev. Agroq. Tecnol. Aliment, 13, 4, 554-58.
- TOMAS, F., SERRANO, F.A. y CARPENA, O.- 1973.- "Flavonoides raros en la variedad Salustiana del "Citrus Sinensis". I. Rev. Agroq. Tecnol. Aliment. 13, 1, 99-103.
- TSWETT, N.- 1903). Próc. Warsaw Soc. Nat. Sci. Biol. Section, 14 Memoria núm. 6.
- WEBER, H.J. BATCHELOR, L.D.- 1948.- The Citrus Industry. Vol. I. University of California Press Berkeley. Los Angeles.
- WILDANGER, W. y HERRMANN, K.- 1973.- "Qualitative nachweis und quantitative bestimmung von flavonen". J. Chromatography, 76, 433-40.
- WILK, M., ROCHLITZ, J., y BENDEN, H.- 1966.- "Säulen-chromatographie von polycyclischen aromatischen Kohlen Wassertoffen an Lipophilen Sephadex LH-20". J. Chromatog. 24, 414.
- YAMAMOTO, OSHIMA, Y.- 1931.- "A new glucoside, Citronin, from the peel of lemon Ponderosa (Citrus Limon, Burm F. Ponderosa Hort) J. Agr. Chem. Soc. 7, 312-319.

Reunido el Tribunal que suscribe en el día  
de la fecha, acuerdo calificar la presente Tesis  
Doctoral con la censura de ~~habilitado en grado~~  
Madrid, 2 Abril 1972











UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



540829013